

T  
601

96450

6450



a abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:  
DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS

***“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CRISTALOGRÁFICA  
Y FÍSICOQUÍMICA DE UN POLIMORFO MONOHIDRATADO  
DE TESTOSTERONA”***

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

P R E S E N T A

**MARIBEL SÁNCHEZ RAMOS**

MATRÍCULA 203180665

COMITÉ TUTORAL

TUTOR: DR. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARREDA

ASESOR: DR. MANUEL SORIANO GARCÍA

ASESORA: M. EN C. MARCELA HURTADO Y DE LA PEÑA

México D.F.,

Diciembre de 2006

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CRISTALOGRÁFICA Y FISICOQUÍMICA DE  
UN POLIMORFO MONOHIDRATADO DE TESTOSTERONA”**

**FIRMAS DE CONFORMIDAD DEL COMITÉ TUTORAL**

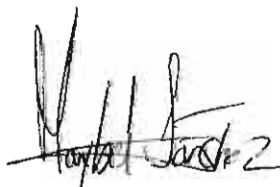


**TUTOR: DR. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARREDA**



**ASESOR: DR. MANUEL SORIANO GARCÍA**

**ASESORA: M. EN C. MARCELA HURTADO Y DE LA PEÑA**

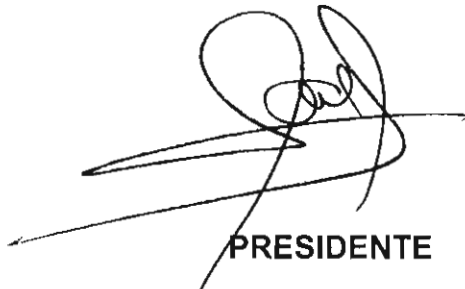


**MARIBEL SÁNCHEZ RAMOS**

**MATRÍCULA 203180665**

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CRISTALOGRÁFICA Y FÍSICOQUÍMICA DE  
UN POLIMORFO MONOHIDRATADO DE TESTOSTERONA”**

**JURADO**



**PRESIDENTE**

**DR. BENITO DEL CASTILLO GARCÍA**



**VOCAL**

**DR. JOSÉ REYES GASGA**



**SECRETARIO**

**DR. CARLOS TOMÁS QUIRINO BARREDA**

## RESUMEN

La testosterona es un fármaco prácticamente insoluble en agua que presenta polimorfismo y distintas fases de pseudopolimorfismo. Para obtener únicamente la fase cristalina – polimorfo o pseudopolimorfo – de interés, en condiciones de cristalización factibles de reproducir y escalar a niveles de producción, es preciso establecer primero a escala de laboratorio, los parámetros fisicoquímicos del medio o sistema de cristalización, debiéndose asimismo construir entre otra información, curvas de solubilidad en mezclas disolventes, y cuantificando el soluto con un método analítico validado.

Por lo anterior, y considerando que en la actualidad hay un incremento en el comercio internacional derivado de la globalización de mercados y de los acuerdos comerciales entre países, así como el impulso en las políticas públicas para la prescripción de medicamentos genéricos, no resulta raro una mayor atención sobre las condiciones de obtención de las materias primas y de sus especificaciones de calidad, porque según haya sido el proceso de obtención, serán las propiedades ya señaladas y la viabilidad de la forma farmacéutica que los incluya (**Díez-Rodrigálvarez M. V., 1999; Quirino C. T. et al. 2003**).

Para este estudio fue seleccionado como fármaco de interés el esteroide testosterona, que en condiciones normales de temperatura y presión existe como sólido de baja solubilidad en agua y presenta distintos polimorfos o solvatomorfos. Se abordó como problema de investigación la manera de obtener un polimorfo monohidratado de testosterona – el monohidrato I -, con la perspectiva de ser utilizado en la formulación de una suspensión parenteral como sistema de liberación retardada. Para alcanzar los objetivos del proyecto fue preciso validar primeramente un método analítico por espectroscopia ultravioleta, con los parámetros de una guía de validación de métodos analíticos, para determinar el ámbito de su validez y posteriormente, obtener los polimorfos de testosterona y construir las respectivas curvas de solubilidad, en sus formas cristalinas anhidra y monohidratada, polimorfos I y II, en agua y mezclas acetona- agua y etanol- agua.

Así, en el presente estudio se logró establecer las condiciones fisicoquímicas para obtener de manera reproducible los monohidratos I y II de testosterona, habiendo sido

necesario el estudio del sistema de cristalización mediante cambios en los sistemas disolventes, así como de las condiciones de temperatura que requiere la cristalización.

Entre las condiciones impuestas previamente para seleccionar los disolventes y las condiciones de cristalización, estuvieron: 1) la factibilidad de su uso para el escalamiento a nivel industrial y 2) el relativo bajo costo e impacto ambiental.

Para la identificación de los polimorfos y la definición de los sistemas de cristalización se usaron las técnicas de la calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry, DSC), la espectroscopía al infrarrojo (IR) y la difracción de rayos X de polvos y de monocristal, con lo cual se logró la caracterización de las distintas fases sólidas de la testosterona y de sus magnitudes fisicoquímicas, habiéndose realizado finalmente, los estudios correspondientes a la velocidad de disolución intrínseca.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor el Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda, por su dedicación y el gran apoyo académico recibido. Además, por toda la paciencia que fue capaz de tenerme así, como la confianza otorgada.

A mi asesor el Dr. Manuel Soriano García, por las interesantes clases de cristalografía y por mostrarme que existen otras áreas de vital importancia para el desarrollo de la Tecnología Farmacéutica.

A mi asesora la M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña, por el apoyo moral y el gran interés puesto en la realización de este proyecto así, como las valiosas observaciones realizadas.

Al Centro A. F. de Estudios Tecnológicos, S. A. (CAFET), por la espléndida visión de mantener la interacción Industria – Universidad, y por las facilidades otorgadas para la realización de éste proyecto.

A mis compañeros y amigos del departamento de Analítica, en especial a Paty, Fidel, Gonzalo, Sergio y Juan Ramón por el ánimo y apoyo durante las diferentes etapas académicas de la maestría.

A mis amigos Paty C., Dorita, Raziel, Ximena, Alejandra y Ulises por escucharme en los momentos de crisis que produjo esta empresa y obtener siempre las respuestas más reconfortantes.

A mis sinodales: Dr. Benito Del Castillo García y José Reyes Gasga, por sus oportunas observaciones y asistencia en la terminación de éste proyecto.

## **DEDICATORIAS**

A mi abuelo (q.e.p.d), ¡esté donde esté!

A mi mamá, la señora Rogelia por su infinito amor, y por enseñarme que los sueños se pueden lograr - aún en la adversidad – con constancia y perseverancia, por ser mi cobijo y la joya más preciada que mis ojos puedan ver.

A mis hermanos, Jesús, Llasmin, Julio César y Javier, por su cariño y por compartir conmigo día a día mis ilusiones, los amo. Obviamente no puedo dejar de mencionar a mis queridos sobrinos Alejandro, Dafne, Allison, Lakshmi y Yoltzin por contagiarme constantemente de su energía y sus sonrisas.

Fernando

A ti, por hacerte presente sin importar las tempestades ya que siempre las sosiegas con amor, y por ser la persona que embellece, nutre y alienta mi vida.

¡Te amo!



ÍNDICE	Página
1. Introducción	2
2. Antecedentes	6
2.1 Características fisicoquímicas y biológicas de la testosterona	7
2.1.1 Efectos fisiológicos	10
2.1.2 Metabolismo	11
2.2 Terapia hormonal de reemplazo	12
2.3 Farmacia molecular y cristalografía	13
2.3.1 Propiedades físicas y químicas de sistemas cristalinos	14
2.3.2 Supersaturación	15
2.3.3 Nucleación	16
2.3.4 Cristalización	17
2.4 Cristales y retículos	19
2.4.1 Elementos de simetría	21
2.4.2 Sistemas cristalinos	22
2.4.3 Redes de Bravais	
3. Elementos fisicoquímicos de las disoluciones	24
4. Técnicas analíticas instrumentales para evaluar materiales cristalinos.	29
4.1 Difractometría de rayos X	29
4.2 Contenido de agua	35
4.3 Microscopía óptica	36
4.4 Espectroscopía de absorción al infrarrojo	36
4.5 Espectrofotometría visible y ultravioleta	41
4.6 Análisis térmicos	42
4.6.1 Calorimetría diferencial de barrido	43
4.7 Velocidad de Disolución Intrínseca	46
4.7.1 Teorías de disolución	47
5. Planteamiento del problema	52

6. Hipótesis	55
7. Objetivo general	57
7.1 Objetivos particulares	57
8. Materiales y métodos	59
8.1 Reactivos	59
8.2 Materiales y Equipo	59
8.3 Caracterización de la materia prima de referencia de testosterona	60
8.4 Validación del método analítico por espectrofotometría ultravioleta, para los estudios de solubilidad de testosterona.	60
8.4.1 Preparación de la muestra	60
8.4.2 Especificidad a la membrana de extracción	61
8.4.3 Linealidad del sistema	61
8.4.4 Precisión del sistema	62
8.4.5 Linealidad del método	62
8.4.6 Exactitud del método	63
8.4.7 Precisión del método	63
8.4.8 Robustez	63
8.5 Obtención, identificación y caracterización de los polimorfos de testosterona monohidrato.	64
8.5.1 Contenido de agua	65
8.5.2 Microscopía óptica con luz transmitida	65
8.5.3 Espectroscopía al infrarrojo	65
8.5.4 Difractometría de rayos X	64
8.5.5 Calorimetría diferencial de barrido	66
8.5.6 Ensayo de velocidad disolución intrínseca por la técnica de Wood	66
8.6 Obtención de curvas de saturación y solubilidad de testosterona en distintos sistemas disolventes.	68
8.6.1 Determinación de las magnitudes termodinámicas del proceso de solubilización.	69
9. Resultados de la caracterización de la testosterona materia prima	71

9.1	Identificación y análisis de calidad de testosterona anhidra.	72
9.2	Validación del método analítico por espectrofotometría ultravioleta, para cuantificar testosterona en los estudios de solubilidad.	72
9.3	Obtención, identificación y caracterización de los polimorfos de testosterona monohidratada.	80
9.4	Curvas de saturación de testosterona y determinación de las magnitudes termodinámicas de solubilización en agua y en las mezclas de disolventes.	92
10.	Conclusiones	100
11.	Bibliografía	103
12.	Anexos	
12.1	Tablas de solubilidad para testosterona anhidra y los monohidratos I y II, en diferentes sistemas de disolventes	113

**Abreviaturas**

Å	Unidades Ångstrom
C.V.	Coeficiente de variación
D.E	Desviación estándar
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
g	Gramo
IR	Infrarrojo
L	Litro
LC	Límite de confianza
mg	Miligramos
mL	Mililitros
°C	Grados Celsius
SR	Estándar de referencia
UV	Ultravioleta
$\alpha$	Ángulo alfa
$\beta$	Ángulo beta
$\gamma$	Ángulo gamma
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{m}$	Micrómetros
USP	United States Pharmacopeia
IC <sub>95%</sub>	Intervalo de confianza al 95%
$\sigma^*$	Sobresaturación crítica
$X_B$	Fracción molar
$\Delta H$	Entalpía
$\Delta S$	Entropía
R	Constante de los gases
SI	Unidades del sistema internacional
ng	Nanogramos
dL	Decilitros

# ***INTRODUCCIÓN***

## 1. INTRODUCCIÓN

El polimorfismo es un problema de particular importancia para la industria farmacéutica, ya que desde la década de los años 50 del siglo XX, se ha notificado que la biodisponibilidad y otras propiedades farmacotécnicas de ciertos fármacos se ven afectadas por su polimorfismo y su solvatomorfismo, de modo que dependiendo de como han quedado conformadas las moléculas al momento de cristalizar (polimorfismo), y si además en el arreglo tridimensional cristalino han quedado como parte estructural y en proporciones estequiométricas, moléculas de disolvente (solvatomorfismo), las propiedades fisicoquímicas del fármaco cristalino como su solubilidad y velocidad de disolución, tendrán efecto directo sobre su biodisponibilidad **(Higuchi T., 1958; Haleblan J. K., et al. 1975; Greco Macle C. M., 1986)**.

Numerosos fármacos como los barbituratos, esteroides y antihistamínicos exhiben polimorfismo. El polimorfismo es un término técnico que describe el hecho de que algunas sustancias naturales o sintéticas, adoptan diferentes conformaciones -fases- o arreglos tridimensionales en el estado sólido cristalino **(Sands D., 1993)**. Los polimorfos tienen las mismas propiedades en estado líquido o gaseoso, pero se comportan de manera diferente en estado sólido, ya que al cambiar la configuración y la asociación de las moléculas en la red, la energía de cohesión de esta red también varía, por ello cada forma cristalina actúa como si fuera un compuesto distinto **(Haleblan J. K., et al., 1969, 1975; Tiller W., 1991)**.

Las principales propiedades afectadas cuando una sustancia forma polimorfos, son entre otras: la temperatura de fusión y de sublimación, la capacidad calorífica, conductividad, volumen, densidad, viscosidad, forma exterior del cristal (hábito), el color, índice de refracción, solubilidad, velocidad de disolución, higroscopicidad y estabilidad **(Shefter E., 1981; Otsuka M.; Matsuda Y., 1995)**.

Por lo general, los polimorfos de las sustancias de interés farmacéutico se forman durante la cristalización de los compuestos en distintos sistemas de disolventes y por modificaciones en las condiciones de cristalización, como la temperatura y/o presión o por activación mecánica, como ocurre durante las operaciones unitarias de fragmentación y compresión, entre otras posibilidades **(Wall G. M., 1986)**.

Debido a lo anterior, para caracterizar y realizar el control de la calidad de las

materias de uso común en la Tecnología Farmacéutica, así como disponer de los medios y mecanismos de control de los cambios físicos y químicos involucrados en el diseño y producción de los medicamentos, el farmacéutico recurre a distintas técnicas analíticas instrumentales. Es por ello que en este orden de ideas, para la obtención y caracterización de los monohidratos de testosterona, se requirió primeramente, de validar un método analítico capaz de cuantificar este principio activo en solución.

Durante la validación del método analítico para la cuantificación de testosterona, el ensayo de especificidad a la membrana demostró que no hubo alteración en los valores de longitud de onda de máxima absorción, ni en el comportamiento global de la curva de barrido de longitud de onda máxima. El sistema analítico demostró ser lineal en una escala de 5.0 a 35.0  $\mu\text{g/mL}$  de testosterona. Por otra parte, el método mostró ser exacto y reproducible, cumpliendo con los parámetros correspondientes y la muestra analítica fue estable al menos 48 horas después de su preparación y cuando es almacenada a temperatura ambiente y en condiciones normales de ciclos de luz y oscuridad.

Para obtener los polimorfos monohidratados I y II de la testosterona, se recristalizó testosterona anhidra disuelta en distintas mezclas disolventes. Una vez definido el sistema disolvente en el que se obtenía de manera reproducible cada polimorfo, se procedió al estudio de los sistemas de cristalización que pudieran ser escalables a nivel industrial para tener datos con los cuales relacionar la temperatura con el rendimiento de masa del polimorfo de interés. Esto último se realizó mediante la construcción de curvas de solubilización reparando sistemas de saturación con exceso de testosterona en agua y en mezclas etanol:agua 90:10 y de acetona:agua 90:10 y 80:20.

Las temperaturas de estudio fueron, para el caso del agua: 15°, 25°, 35°, 45° y 55°C; para las mezclas binarias se evaluó la solubilidad a 15°, 25° y 35°C.

Los datos de solubilización de las distintas fases sólidas de testosterona en agua y en las mezclas disolventes, dieron lugar a curvas polinomiales, con diferencias significativas en la solubilidad entre cada una de las fases en estudio. Esta información junto con los valores de calor de fusión obtenidos por calorimetría diferencial de barrido y la aplicación entre otras de la ecuación de vant' Hoff, permitió la determinación de

diferentes magnitudes termodinámicas con lo que se diferenció el comportamiento fisicoquímico en solución de la testosterona anhidra y sus monohidratos I y II.

Las técnicas de difracción de rayos X, la calorimetría diferencial de barrido y la espectroscopia infrarroja demostraron inequívocamente, que la testosterona cristalizada de un mezcla de disolventes etanol:agua en la proporción de (90:10) permite obtener de manera reproducible el monohidrato I de testosterona, con baja solubilidad -mayor estabilidad acuosa- y se considera adecuado para formularse en una suspensión inyectable.



# ***ANTECEDENTES***

## 2. ANTECEDENTES

A finales de los años 60 del siglo XX surgió la Biofarmacia como una nueva disciplina científica de la farmacia, que correlacionaba los campos tecnológicos y clínico dando lugar a estudios tendentes a la determinación de la efectividad terapéutica de los medicamentos.

Para resolver los problemas de biodisponibilidad de los medicamentos, tradicionalmente se ha recurrido a la modificación empírica de sus formulaciones y de los procesos de fabricación. No obstante, en la actualidad la denominada *Farmacia Molecular* (**Hüttenrauch R., 1988**), ofrece hoy la posibilidad, con el conocimiento del *grado de orden* de los sólidos y sus alternativas de modificación, predecir y manejar su comportamiento en la formulación, así como su estabilidad.

El estudio del orden de los sólidos farmacéuticos atañe a fármacos y excipientes, resultando tener múltiples aplicaciones; por ejemplo, se ha observado que una suspensión de cristales de hábito planar puede ser inyectada a través de una aguja de diámetro pequeño –inyectabilidad- con mayor facilidad que una suspensión de cristales del mismo tamaño, pero de hábito acicular. Asimismo el hábito y la forma cristalina también pueden influir en otras propiedades farmacotécnicas como la compactabilidad y compresibilidad de algunos polvos.

Por otra parte, la presencia de impurezas durante la formación de los cristales se utiliza para modificar el hábito y la estructura cristalina de los sólidos, resultando de la inhibición o aumento de la disolución del compuesto principal y afectando su biodisponibilidad (**Quirino C. T., 2001**).

La Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica, destaca en la actualidad (**Raw A. S., 2004**), la necesidad de disponer de procedimientos analíticos apropiados para detectar polimorfismo, formación de hidratos o amorfos en los fármacos sujetos a registro sanitario y que la responsabilidad tanto de la obtención reproducible de estas fases sólidas, como de la garantía de su identificación, recae en un primer momento en el productor de la materia prima, seguida por un control de

posibles transformaciones durante los distintos procesos de fabricación, por parte de los laboratorios productores de los medicamentos.

Debido a lo anterior cobra cada vez mayor importancia la utilización de técnicas analíticas instrumentales como la difracción de rayos X y la espectroscopia al infrarrojo para realizar análisis, tanto cualitativo como cuantitativo de las materias primas, a modo de tener la capacidad de diferenciar entre formas polimórficas, solvatos y amorfos de los compuestos en polvo, al igual que en la determinación de su pureza y estabilidad.

En cuanto a otras técnicas instrumentales que permiten la identificación de formas amorfas y polimorfas, así como la presencia de solvatos y que de igual forma son útiles para la determinación de la estabilidad física y química de las materias primas farmacéuticas, se encuentran las que se basan en métodos térmicos como el análisis termogravimétrico (TGA), análisis térmico diferencial (DTA) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Así, en los últimos años se ha demostrado el amplio campo de las aplicaciones analíticas de las técnicas instrumentales basadas en cambios de las características o propiedades caloríficas y de temperatura, al igual que las espectroscópicas (UV-VIS), para la cuantificación de la pureza de las materias primas, la determinación de distintas magnitudes termodinámicas de soluciones, así como el diseño de formulaciones y los correspondientes estudios de estabilidad de fármacos y medicamentos.

## 2.1 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE LA TESTOSTERONA.

### *Descripción*

Se le describe como un polvo cristalino de color blanco o crema, inodoro, insoluble en agua, parcialmente soluble en alcohol, soluble en acetona, cloroformo y éter (**USP, 29**). La forma anhidra es insoluble en agua, pero los polimorfos monohidratados todavía lo son menos.

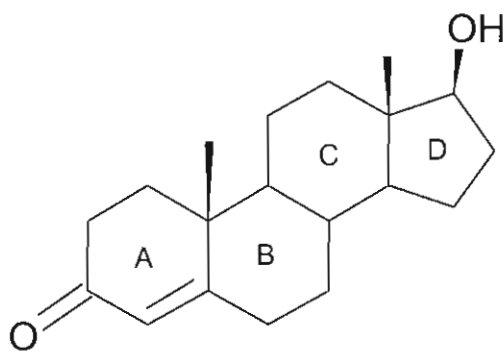
### Estructura y composición química

El análisis elemental del compuesto presenta los siguientes valores: (**Merck Index, 2001**).

Carbono:	79.12%
Hidrógeno:	9.78%
Oxígeno:	11.09%

Roberts P. J. (**1978**) encontró que la testosterona solidifica en forma anhidra como un sistema cristalino monoclinico, utilizando una mezcla de disolventes de etanol:acetato de etilo. Los valores encontrados para la celda unitaria son similares con los encontrados en un sistema de disolventes etanol:agua (90:10).

### Fórmula estructural



La testosterona es un andrógeno, esteroide, derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno, que tiene 19 átomos de carbono, un doble enlace entre C4 y C5, un átomo de oxígeno en C3 y un radical hidroxilo (OH) en C17.

*Datos de la celda unitaria del cristal anhidro de testosterona*

Sistema cristalino: Monoclínico

a = 14.720 Å

b = 11.080 Å

c = 10.868 Å

$\alpha = 90.0^\circ$

$\beta = 113.34^\circ$

$\gamma = 90.0^\circ$

**Tabla A. Características químicas y cristalográficas de la testosterona anhidra. †**

Parámetro	Valor
Átomos	49
Átomos pesados	21
Agua	0
Fórmula química	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	288.424 Daltons
Centro de geometría	2.0402 -1.3361 -0.5827 Å
Centro de masa	2.0365 -1.0283 -0.5607 Å
Dimensiones aproximadas	8.8950 13.3390 7.8940 Å
Area de superficie (1.40)	480.4 Å <sup>2</sup>
Área polar (PSA)	89.4 Å <sup>2</sup> (apolar = 391.1 Å <sup>2</sup> )
Volumen	281.0 Å <sup>3</sup>

† Cfr.: (Pedretti A., Villa L., Vistoli G., 2002)

**Tabla B. Características químicas y cristalográficas de la testosterona monohidrato.‡**

Parámetro	Valor
Átomos	52
Átomos pesados	22
Agua	1
Fórmula química	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>
Peso molecular	306.440 Daltons
Centro de geometría	2.2103 -1.5986 -0.3769 Å
Centro de masa	2.2003 -1.3014 -0.3608 Å
Dimensiones aproximadas	9.2240 13.6500 9.1500 Å
Area de superficie (1.40)	520.7 Å <sup>2</sup>
Área polar (PSA)	142.7 Å <sup>2</sup> (apolar = 378.0 Å <sup>2</sup> )
Volumen	298.9 Å <sup>3</sup>

‡Cfr.: (Pedretti A., Villa L., Vistoli G., 2002)

La testosterona es una molécula que ha demostrado presentar polimorfismo, así en estudios realizados por Messley y Johnson (1965), se notificó la existencia de este fármaco en 3 formas cristalinas, y por su parte Kurther y Janger (1965), informaron de cuatro polimorfos. Así mismo, Kang (1974), informó de seis formas polimórficas, las cuales tienen distintas propiedades fisicoquímicas y de disolución. Gharavi y James (1983) mostraron que la testosterona puede a su vez cristalizar como distintos polimorfos cuando se utiliza octanol y otros alcoholes alifáticos de 5 a 10 carbonos. También se ha documentado la formación de dos monohidratos de testosterona (Frokjaer S., Andersen S., 1974), los cuales son menos solubles que la forma anhidra.

### 2.1.1 Efectos fisiológicos

En los varones normales, la testosterona genera los cambios que se presentan en la pubertad y además de favorecer el crecimiento general de los tejidos corporales, es responsable del crecimiento del pene y el escroto. Su efecto en las modificaciones de la piel incluyen: la aparición de vello púbico, axilar y barba. Asimismo se le atribuye

que las glándulas sebáceas sean más activas y la piel tienda a engrosarse y ser más grasosa; crece la laringe y las cuerdas vocales se engrosan, lo que hace la voz de tono más bajo.

Cuando la testosterona no modificada es administrada por vía oral, es rápidamente absorbida hacia la sangre portal, y luego del primer paso de degradación por hígado, muy pequeñas cantidades de testosterona alcanzan la circulación sistémica. De manera similar, cuando la testosterona es administrada por vía parenteral es absorbida desde el sitio de la inyección y degradada en forma rápida, por lo que los niveles efectivos de andrógenos en el plasma no son sostenidos. Para solucionar este problema, se han requerido de modificaciones químicas (ésteres) en la testosterona para retardar la velocidad de absorción y su catabolismo (**Smith C., 1998**). Otra opción es el uso de las modificaciones físicas sobre la testosterona base para obtener distintos polimorfos y pseudopolimorfos (solvatos), lo cual, sólo ha sido utilizado como recurso tecnológico en USA para formular sistemas de liberación retardada, no así en los productos comercializados en México (**PLM, 2006**).

### **2.1.2 Metabolismo**

En los humanos el andrógeno más importante es la testosterona secretada por los testículos. En varones se produce aproximadamente 8 mg de testosterona al día. Cerca del 95% se produce por las células de Leydig y sólo 5% por las suprarrenales. La concentración plasmática de testosterona en el adulto normal es de 300 a 1000 ng/dL. Antes de la pubertad la concentración es menor a 20 ng/dL. El contenido de testosterona en el testículo humano es de aproximadamente 300 ng/g de tejido. En el hombre adulto el testículo produce entre 2,5 y 11 mg/día de testosterona.

En algunas células blanco, la testosterona es convertida a dihidrotestosterona por acción de la 5  $\alpha$ -reductasa. En otros tejidos y órganos, entre ellos el tejido adiposo, el hígado y el hipotálamo, se convierte en estradiol por acción de la P450 aromatasa y puede ser de importancia en la regulación de la función gonadal (**Goodman A., 2003**).

La principal vía para la degradación de este andrógeno en los seres humanos sucede en el hígado. La reducción del doble enlace y la cetona en el anillo A (ver

estructura), conduce a la producción de sustancias inactivas como la androsterona y la etiocolanolona, que luego se conjugan con el ácido glucurónico y se excretan en la orina.

## **2.2 Terapia hormonal de reemplazo (TRH).**

La andropausia es un nuevo concepto establecido por muchas especialidades y cuya definición no está universalmente aceptada y se refiere a la disminución progresiva de la producción de andrógenos en el hombre, asociada a la senectud **(Comhaire F. H., 2000)**. El término andropausia es biológicamente incorrecto y clínicamente inapropiado, sin embargo se utiliza para describir los cambios físicos y emocionales que se presentan secundariamente en el hombre de edad avanzada, asociados a las alteraciones hormonales, el síndrome se caracteriza por alteraciones en los dominios físico e intelectual y los cuales pueden ser corregidos con la manipulación de los niveles circulantes de andrógenos.

El proceso de declinación hormonal no es igual en todos los hombres, a diferencia de lo que ocurre en la mujer en donde la menopausia se presenta con cierta similitud y universalmente para el sexo femenino, como una manifestación secundaria a la falla ovárica **(Morales A., Heaton J. P., Carson C. C., 2000)**.

Los síntomas que refieren los hombres adultos mayores, atribuidos a la disminución de las concentraciones de testosterona, sugieren la posibilidad de utilizar terapia hormonal de reemplazo en ellos **(Brain J., 2001)**.

Entre las ventajas que se atribuyen a la terapia de reemplazo hormonal, se señala: la mejoría de la libido y de la actividad sexual, el aumento de la masa ósea y la disminución de la grasa visceral, así como la mejoría de las funciones cognitivas, lo que se traduce evidentemente en una mejor calidad de vida. **(Novak A., Brod M., Elbers J., 2002)**.

La forma de presentación de los andrógenos para THR puede ser: como preparados orales, inyectables, parches cutáneos, gel e implantes con el principio activo en forma de distintas sales, existiendo pocos medicamentos de acción prolongada. No



se recomienda el empleo de drogas derivadas de la testosterona 17  $\alpha$  -alquiladas, como la mesterolona, la fluoximesterolona o la metiltestosterona, por poseer efectos hepatotóxico (colestasis y tumor) **(Rain J., 2001)**.

Los parches transdérmicos se presentan en 2 tipos, uno para ser utilizado sobre la piel del escroto y el otro sobre la piel de la espalda, brazo, abdomen y pecho. Son efectivos en elevar los niveles de testosterona hasta la normalidad. Mantienen concentraciones de testosterona más estables; sin embargo, las reacciones alérgicas son frecuentes y su mayor costo determina su poca aceptación **(Matsumoto A.M., 2002)**.

Las formas farmacéuticas de testosterona de acción prolongada, capaces de mantener niveles de andrógenos dentro de márgenes fisiológicos, serán los agentes de elección para la reposición del andrógeno en un futuro cercano. En otras palabras se impone una mayor información de los aspectos relacionados con la andropausia, tanto en la población general como en los profesionales de salud, como una forma de enfrentar este problema y manejarlo integralmente de forma adecuada, con el propósito de mejorar la calidad de vida **(Allan C.A., Mc Lachlan R. I., 2004)** .

### 2.3 FARMACIA MOLECULAR Y CRISTALOGRAFÍA

La ciencia y la tecnología deben el avance vertiginoso que han tenido desde las últimas décadas del siglo XX, a la formación de equipos científicos multi e interdisciplinarios y al desarrollo paralelo de la tecnología en instrumentación analítica, con lo cual el proceso cognoscitivo de la materia ha ido hasta un nivel molecular. Tal desarrollo también se ha dado en el estudio de las formas farmacéuticas y a partir de 1976, surge el término "*Molekular galenik*" – Galénica Molecular – y su equivalente anglosajón y español: "*Molecular Pharmaceutics*" o *Farmacia Molecular* **(Hüttenrauch R., 1988)**. Con lo cual se trató de agrupar una serie de estudios que conformarían una nueva rama de la Farmacia comprometida en descubrir y explicar a un nivel molecular, el origen de las propiedades de los materiales – fármacos, excipientes y formas farmacéuticas -, su comportamiento y cambios estructurales durante los procesos de fabricación.

La innovación y retos que introduce la farmacia molecular como disciplina, es la de establecer las bases teóricas que expliquen el comportamiento de los materiales y formas farmacéuticas, sirviendo de guía al desarrollo de la Tecnología Farmacéutica y la Biofarmacia, así como la reciente disciplina: la Farmacogenética y su gran potencial en el diseño de formas farmacéuticas de liberación controlada.

La farmacia molecular introduce como objeto primario de estudio a las moléculas, desde la elaboración hasta la administración de las formas farmacéuticas y considera a éstas como agregados moleculares.

### **2.3.1 Propiedades físicas y químicas de sistemas cristalinos**

Los estados de la materia corresponden a distintos grados de unión y de orden o de disposición de los átomos o moléculas que forman una sustancia determinada, lo que permite diferenciar a los gases, sólidos y líquidos, en función de la magnitud de las fuerzas de unión de las partículas elementales que los constituyen, así como el orden de su distribución espacial (**Sands D., 1993**).

Al estado sólido, los compuestos pueden obtenerse como amorfos o cristalinos y dentro de estos últimos, en forma anhidra, hidratada o solvatada, lo cual dependerá en la mayoría de los casos, de las características fisicoquímicas del medio y las condiciones de cristalización.

La cristalización y decristalización (disolución) a partir de soluciones y otros sistemas en dispersión que involucran fármacos en fases líquidas o semisólidas, son fenómenos de sumo interés para obtener no sólo una determinada estructura sólida (amorfo o cristal) de un fármaco a partir de su síntesis, sino también para formular un medicamento estable, seguro y eficaz, por lo que es importante comprender de forma integral las etapas y mecanismos involucrados, junto con los modelos teóricos desarrollados para su estudio (**Greco Macle C. M., 1986; Rodríguez – Hornedo N., et al., 1990**).

La metodología analítica empleada para estudiar el polimorfismo no ha variado mucho en los últimos 15 años. Las técnicas analíticas instrumentales más utilizadas han sido la espectroscopía infrarroja, la microscopía de luz polarizada, la espectroscopía de

Raman, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de sólidos, la difracción de rayos X y distintas técnicas de análisis térmico (**Quirino C. T., 2001**).

Cabe señalar que los análisis térmicos son únicos para proporcionar información de datos termodinámicos que intervienen y/o distinguen entre el polimorfismo, el solvatomorfismo y las impurezas de los compuestos (**Giron D., 1986; 1995**).

### 2.3.2. Supersaturación

Una fase cristalina es creada como una consecuencia de un proceso de agregación molecular (prenucleación) en solución, la cual frecuentemente es el resultado de un proceso de sobresaturación. Esta prenucleación puede dar lugar a una agrupación de cierto tamaño que en determinado tiempo sea capaz de crecer como cristales microscópicos.

La sobresaturación de un sistema se puede alcanzar por enfriamiento, por evaporación, o como resultado de una reacción química entre dos fases homogéneas, y es un fenómeno que indica la existencia de un mayor número de partículas del soluto con relación al número de partículas del disolvente, por unidad de volumen de la mezcla en la misma fase. Así, una fase sólida es precipitada de una solución si el potencial químico de la fase sólida es menor que la del componente disuelto (**Mersmann A., 1995**).

El exceso de concentración o potencial químico es llamado supersaturación, este estado puede ser creado por:

- ❖ Métodos que regulan la actividad del soluto o actividad del producto (concentración) incluidos:
  - a. Remoción del disolvente (evaporación o congelamiento).
  - b. Adición de diferentes sales con iones que participan en la precipitación (adición de NaCl a soluciones de fosfato de sodio causando la precipitación de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).
  - c. Disolución de una fase sólida metaestables (transformaciones de amorfos a cristalinos, anhidros a hidratos, polimorfos más solubles a menos solubles).

- ❖ Métodos que regulan la solubilidad del soluto
  - a. Cambios de temperatura
  - b. Cambio de pH
  - c. Adición de solventes o aditivos que disminuyen la solubilidad del soluto.

### 2.3.3. Nucleación

La nucleación es frecuentemente el paso decisivo en el proceso de cristalización y es de gran importancia práctica en sistemas farmacéuticos. La cristalización puede ocurrir naturalmente o no, durante los procesos farmacéuticos cuando la condición de supersaturación es lograda (**Boistelle R.; Astier J. P., 1988**).

El valor de la sobresaturación crítica ( $\sigma^*$ ) depende en primera instancia de la naturaleza del soluto y del sistema disolvente, al igual que de otros factores tales como la temperatura, de efectos mecánicos como la agitación, de la velocidad de enfriamiento y la historia térmica del proceso, así como de la presencia de electrolitos y cualquier agente contaminante. No menos importante para este valor es el tipo de nucleación involucrada.

#### Mecanismos de nucleación

Los mecanismos de nucleación puede dividirse en dos categorías: homogénea y heterogénea. La nucleación homogénea raramente ocurre en volúmenes grandes (más de 100  $\mu\text{L}$ ) porque las soluciones contienen impurezas al azar que pueden inducir la cristalización (**Perepezko J. H., 1977, 1994**). Este tipo de nucleación es heterogénea. Una superficie o una interfase de diferente composición que el soluto que se desea cristalizar puede servir como un sustrato para la nucleación. La nucleación que es promovida por cristales del soluto que se desea cristalizar es conocida como nucleación secundaria (**Myerson A. S., 1993**).

- ❖ **Nucleación homogénea.** La fase sólida se genera en el seno de una fase inicialmente homogénea, ya sea en solución, fundido o vapor, y se debe a la

interacción entre las moléculas, átomos o iones dispersos en el medio y que por efecto de dicha interacción se agregarán para integrar el sólido cristalino.

Este proceso necesita un valor alto de  $\sigma^*$  y es característico de venas y yacimientos minerales como calcita y pirita. (Zettlemoyer A. C., 1969).

- ❖ **Nucleación heterogénea.** En este caso la nucleación se produce aprovechando la presencia de un sustrato distinto al soluto, que se encuentra en el medio y tiene la virtud de disminuir el valor de  $\sigma^*$  con relación al valor que se tendría en una nucleación homogénea.

Es el proceso de nucleación más frecuente en la naturaleza y también en el laboratorio, ya que incluso cuando se ve desarrollarse un monocristal aislado, puede que en realidad haya existido una impureza inicial actuando como sustrato.

Este tipo de nucleación también puede presentarse sobre cristales de la misma composición, después de ocurrir un cambio en las condiciones fisicoquímicas durante el proceso de crecimiento, con lo cual se puede observar cristales con cambios de hábito o tamaños de cristal son diferentes.

Cuando la nucleación heterogénea se produce sobre la cara de un monocristal, de manera que los nuevos cristales adoptan una disposición orientada regularmente, el fenómeno de crecimiento se denomina *epitaxial* (Rodríguez – Hornedo N., et al.; 1992), el cual se produce entre sustancias químicamente diferentes y, si se trata de un mismo compuesto (polimorfos), se denomina *sintaxia*. Ambos fenómenos se producen por lo general cuando existe una gran semejanza en la forma y dimensiones del retículo cristalino de las dos sustancias.

#### 2.3.4. Cristalización

Los conocimientos sobre los mecanismos de cristalización son importantes para el desarrollo de procesos, formulación racional y estabilidad de los productos farmacéuticos (Nichols G.; Frampton C. S., 1998).

Los sólidos metaestables incluyen sólidos amorfos, polimorfos y solvatos y el conocimiento de la cinética y los mecanismos de cristalización determinan la extensión para que un compuesto metaestable sea logrado y mantenido o bien, provee los medios para reducir la energía libre del sistema a un estado más estable.

Así pues, la información sobre la cinética de cristalización es importante para el control de la nucleación y de la velocidad de crecimiento del compuesto de interés en estado sólido; como lo es también para la distribución del tamaño de las partículas (número de partículas, diámetro medio) y de la forma o morfología de la partícula (**Nyvit J.; Söhnel O.; et al., 1985**). Es por ello que la falta de control en la cinética de cristalización determina la aparición de las modificaciones cristalinas, lo cual ha sido reconocido así por la FDA (Food and Drug Administration) y está descrito en las guías para la manufactura de fármacos (**Bryn S., 1995**). Así por ejemplo, Dunitz y Bernstein (**1995**), documentaron casos que proveen evidencia de las consecuencias de cambios durante los procesos de cristalización en sistemas polimórficos.

El mecanismo y la velocidad por el cual se forman los cristales desde soluciones líquidas suele ser determinado por diferentes factores (**Mullin J. W., 1993**), incluyendo:

- ❖ Solubilidad del producto (la solubilidad del producto es importante en soluciones de composición no estequiométricas).
- ❖ Supersaturación: concentración del soluto por ser cristalizado.
- ❖ Difusividad o viscosidad
- ❖ Temperatura
- ❖ pH
- ❖ Disolvente(s)
- ❖ Aditivos solubles e impurezas
- ❖ Reactividad de superficies alrededor de la nucleación.
- ❖ Volumen de la solución.
- ❖ Velocidad a la cual la supersaturación es creada: velocidad de enfriamiento, velocidad de congelamiento y la velocidad en el cambio de pH.

## 2.4 Cristales y retículos

La Cristalografía es una disciplina que estudia la estructura y las propiedades del estado cristalino de moléculas pequeñas y macromoléculas sintéticas y biológicas. Los cristales han sido material de estudio y especulación durante cientos de años. Así, en 1669, el danés y médico de la corte, Nicolaus Steno y Romé de Isle, propuso que durante el crecimiento de los cristales los ángulos de las caras permanecen constantes; esta expresión es conocida como la *ley de constancia entre los ángulos diedros* entre caras del cristal y desde el punto de vista farmacéutico es importante, ya que determina su hábito. En 1774 Abbe Häuy sugirió que las regularidades microscópicas de los cristales se podían explicar si los cristales estuvieran formados por pequeños bloques que se repiten periódicamente. Estos pequeños bloques son las celdas unitarias o elementales (*ley de racionalidad*). La comprobación se realizó en 1912, cuando Friedrick, Knipping y von Laue demostraron que los cristales difractan la radiación de los rayos X en sólo ciertas direcciones, implicando que existe un arreglo periódico y tridimensional de los centros dispersores.

A comienzos del siglo XIX se crearon las bases de la ciencia de la simetría de los cristales, se descubrió la *ley de las zonas* y se procedió a la clasificación de los cristales. Hessel, en 1830, fue el primero en deducir todas las formas de simetría de los cristales y en 1867, el académico A. Gadolin, científico ruso, basándose en las *leyes geométricas*, dedujo los 32 tipos de simetría de los cristales.

Fue el descubrimiento de los rayos X en 1895 lo que revolucionó el antiguo campo de la Cristalografía, que hasta entonces sólo había estudiado la morfología de los minerales, de modo que la introducción de los difractómetros permitió evaluar también la cristalinidad de distintos materiales orgánicos.

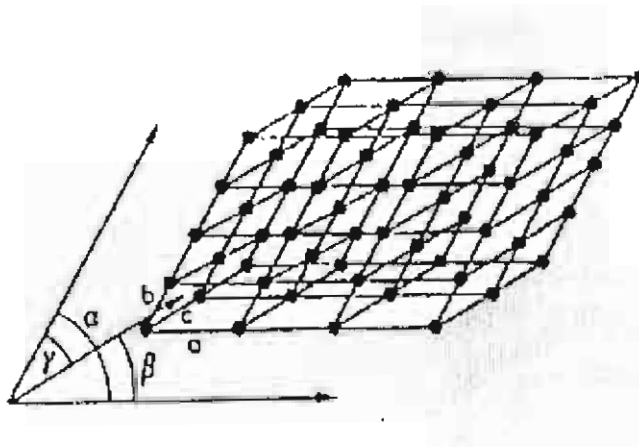
Por definición un cristal se compone de átomos, moléculas o iones dispuestos en un modelo que se repite periódicamente en las tres dimensiones.

Frecuentemente, los cristales tienen formas poliédricas características, limitadas por caras planas, aristas cortantes, y una gran parte de su belleza se debe a este desarrollo de sus caras o hábito.

De ese modo en los cristales, los átomos, los iones o las moléculas se empaquetan dando lugar a motivos que se repiten desde cada 5 Ångstroms, hasta las centenas de Ångstroms ( $1 \text{ Ångstrom} = 10^{-8} \text{ cm}$ ) y a esa repetitividad en tres dimensiones se le denomina estructura cristalina.

El conjunto que se repite de modo ordenado genera todo el cristal y se denomina celda elemental o unidad, su contenido (átomos, moléculas, iones), o sea el *motivo* que se repite, puede describirse por un punto o nodo (el punto reticular) que representa a todos y cada uno de los constituyentes del motivo.

Una celda unitaria tiene diferentes formas dependiendo del sistema cristalino en estudio y es como una plantilla maestra para todo el cristal. Su tamaño viene determinado por la longitud de sus tres aristas ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) y la forma por el valor de los ángulos entre dichas aristas (alfa, beta, gamma:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Vippagunta S. R., et al., 2001).



**Figura 1. Parámetros que caracterizan la forma y tamaño de una celda elemental ó celda unitaria.**

En algunas ocasiones la repetitividad se rompe, no es exacta, y precisamente esa característica es lo que diferencia a los cristales de los vidrios o en general de los llamados materiales amorfos que son desordenados o poco ordenados.



En la estructura cristalina de los materiales inorgánicos, los motivos repetitivos son átomos o iones enlazados entre sí, de modo que generalmente no se distinguen unidades aisladas, de ahí su estabilidad y dureza. Se distinguen claramente unidades aisladas en los materiales orgánicos, en los cuales aparece el concepto de entidad molecular o molécula, formada por átomos enlazados entre sí, pero la unión entre las moléculas dentro del cristal es mucho más débil y por ello estos materiales son blandos e inestables en comparación con los inorgánicos.

En las proteínas como en los materiales orgánicos, también existen unidades moleculares, pero mucho más grandes y las fuerzas que unen estas moléculas son similares, aunque su empaquetamiento dentro del cristal deja muchos huecos que se saturan con agua no ordenada lo que conlleva a un sistema similar a la situación de la proteína en solución.

#### **2.4.1 Elementos de simetría**

Algunos de los primeros estudios sobre cristales fueron motivados por observaciones de su simetría externa: los copos de nieve tienen formas hexagonales; el cloruro sódico forma cubos perfectos; y los cristales de alumbre son frecuentemente octaedros regulares. Otro ejemplo son los cristales de cuarzo, algunas de sus caras forman un arreglo en grupos de dos o más orientaciones similares con respecto a un eje o plano en el cristal, esto es, los cristales muestran simetría. Una operación de simetría es el movimiento real o imaginario de un objeto y el elemento de simetría es el hecho geométrico mediante el cual la operación de simetría se ha llevado a cabo, por ejemplo, un plano, una línea o un punto. Las operaciones de simetría son:

##### **❖ Operaciones propias o rotaciones**

Las rotaciones de 180, 120, 60 y 90°C de un objeto producen las simetrías de rotación 1, 2, 3, 4 y 6.

En los cristales, los ejes de simetría sólo pueden ser binarios (2), ternarios (3), cuaternarios (4) ó senarios (6), dependiendo del número de repeticiones. Las simetrías de rotación igual a 5 o mayor de 6 no son permitidas en la cristalografía ya que no cumplen los requisitos geométricos de la periodicidad en las redes.

## ❖ Operaciones impropias de simetría

Son representadas por la combinación de una reflexión y una rotación. La rotación reflexión binaria se conoce con el nombre de centro de inversión y se denota con el número 1. La rotación reflexión cuaternaria y senaria son representadas por los números  $\bar{3}$ ,  $\bar{4}$  y 6, respectivamente.

### 2.4.2 Sistemas cristalinos

La celda unitaria más simétrica es la cúbica, en donde las dimensiones de los tres vectores son iguales y los ángulos entre vectores forman un ángulo de  $90^\circ$ . En la celda hexagonal, dos de sus vectores son iguales ( $a = b$ ), y equivalentes por simetría, y  $c$  es diferente; y dos de los ángulos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) son  $90^\circ$  y el tercero,  $\gamma$  es  $120^\circ$ . Esto se observa en la tabla C y al mismo tiempo se definen los parámetros de las celdas para cada sistema cristalino. Los siete distintos tipos de celdas unitarias definidos constituyen los siete sistemas cristalinos.

**Tabla C. Sistemas cristalinos, relaciones entre los parámetros y simetría esencial del cristal.**

Sistema cristalino	Parámetro de la celda elemental	Simetría esencial del cristal
Triclínico	$a \neq b \neq c \neq ; \alpha \neq \beta \neq \gamma \neq$	Ninguna
Monoclínico	$a \neq b \neq c \neq ; \alpha = \gamma = 90^\circ , \beta \neq$	Eje binario o espejo (rotación inversión binaria)
Ortorrómbico	$a \neq b \neq c \neq ; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Tres ejes binarios ortogonales (rotación inversión binaria)
Tetragonal	$a = b, c \neq ; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Eje cuaternario (rotación inversión cuaternaria)
Romboédrica	$a = b = c ; \alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	Eje ternario (rotación inversión ternaria)
Hexagonal	$a = b, c \neq ; \alpha = \beta , \gamma = 120^\circ$	Eje senario (rotación inversión senaria)
Cúbica	$a = b = c ; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Cuatro ejes ternarios

### 2.4.3 Redes de Bravais

En 1850, Auguste Bravais demostró que los cristales se podrían dividir en 14 células de la unidad (figura 2), que resuelven los criterios siguientes:

- ❖ La célula de la unidad es la unidad de repetición más simple del cristal.
- ❖ Las caras opuestas de una célula de la unidad son paralelas.
- ❖ El borde de la célula de la unidad conecta puntos equivalentes.

Las Redes de Bravais o celdas unitarias, son paralelepípedos que constituyen la menor subdivisión de una red cristalina que conserva las características generales de toda la retícula, de modo que por simple traslación del mismo, puede reconstruirse el sólido cristalino completo, es decir son derivadas a partir del apilamiento adecuado de mallas (**Brown F. C., 1970**).

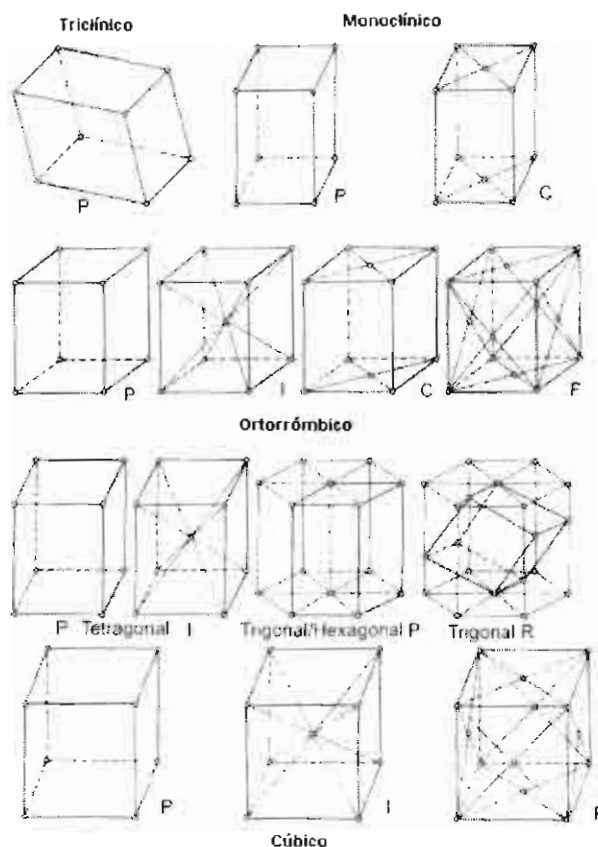


Figura 2. Esquemmatización de las celdas unitarias de las catorce redes de Bravais.

Las redes cristalinas pueden ser simples o primitivas pero debido a consideraciones de simetría estas se pueden dividir en las siguientes formas:

- ❖ **P**: celda primitiva o simple en la que los puntos reticulares son sólo los vértices del paralelepípedo.
- ❖ **F**: celda centrada en la cara, que tiene puntos reticulares en las caras, además de en los vértices. Si sólo tienen puntos reticulares en las bases, se designan con las letras A, B o C según sean las caras que tienen los dos puntos reticulares.
- ❖ **I**: celda centrada en el cuerpo que tiene un punto reticular en el centro de la celda, además de los vértices.
- ❖ **R**: Primitiva con ejes iguales y ángulos iguales o hexagonal doblemente centrada en el cuerpo, además de los vértices.

#### **4. ELEMENTOS FISICOQUÍMICOS DE LAS DISOLUCIONES**

La teoría de la solubilidad se ha venido introduciendo a la Farmacia para ayudar a resolver los distintos problemas que pueden plantearse con el diseño de las formulaciones y la biodisponibilidad de los medicamentos.

De tal forma, los conceptos teóricos aplicados a los fármacos desde la etapa de la preformulación, facilitan procesos farmacéuticos tales como la disolución de fármacos y otros componentes de la formulación en la preparación de soluciones nasales, oftálmicas, orales y parenterales; así como en la incorporación de principios activos en técnicas de microencapsulación, previniendo asimismo los problemas de inestabilidad que pueden surgir por cambios de temperatura, por mencionar algunos ejemplos.

Por otra parte, el conocimiento de la solubilidad de los compuestos en distintos disolventes, no sólo puede ayudar a la selección del sistema apropiado para aumentar la solubilidad, sino también será útil para definir un sistema adecuado de recristalización que permita ejercer un control más fino de las variables del medio y su efecto sobre la saturación, para lograr la cristalización de la fase cristalina deseada.

El efecto más apreciable de la temperatura sobre la solubilidad, obedece a que la entalpía de la disolución suele ser en la mayoría de los casos endotérmica, de modo que se requiere la aportación de calor para disolver el compuesto. Cuando el proceso es exotérmico, se presenta el fenómeno opuesto.

Al representarse el logaritmo de la solubilidad expresada en fracción molar ( $X_B$ ) como función de la inversa de la temperatura absoluta  $1/T$  (°K), el gráfico obtenido corresponde a una gráfica de vant' Hoff, que suele dar una relación lineal cuando se han obtenido los datos a intervalos de temperaturas relativamente pequeños (**Bustamante P., 2001**).

La expresión de la ecuación de vant' Hoff es la siguiente:

$$\ln X_B^i = \frac{-\Delta H^s}{R} * \frac{1}{T} + \text{constante} \quad \text{Ecuación 1}$$

En esta ecuación, la pendiente  $-\Delta H^s / R$  permite calcular la entalpía de disolución ( $\Delta H^s$ ), al sustituir el valor numérico de la pendiente obtenida por regresión lineal de los datos, y expresar R como: 8.3143 J/(°K mol). Así, el valor absoluto de  $\Delta H^s$  expresa la magnitud de la variación de la solubilidad del soluto con la temperatura, y el signo indicará si se absorbe o se desprende calor en el proceso de disolución, según sea positivo o negativo, respectivamente (**Bustamante P., 2001**).

$$\Delta H^s = (\text{pendiente}) * 8.3143 \text{ J}/(\text{°K mol}) \quad \text{Ecuación 2}$$

Con esta expresión de la variación de la solubilidad con la temperatura (ecuación 1), aplicada a la disolución de compuestos en disolventes puros o en mezclas de disolventes, se pueden realizar estimaciones sobre las proporciones de mezcla y los cambios de temperatura necesarios para aumentar la solubilidad, estimar los límites de variación de la temperatura en que se mantiene estable la disolución o bien conseguir la

sobresaturación del sistema, - por sobreenfriamiento, por ejemplo - para propiciar los fenómenos de nucleación y crecimiento cristalino.

### Soluciones ideales y reales

Las soluciones ideales obedecen a la ley de Raoult y se producen cuando las interacciones soluto-disolvente en la disolución son similares a las que existen entre las propias moléculas del soluto y del disolvente. En una solución ideal, las interacciones son debidas sólo a fuerzas de dispersión de London, y no se absorbe ni desprende calor en el proceso de mezcla ( $\Delta H^M=0$ ). La solubilidad ideal,  $X_B^i$ , de un principio activo sólido a una temperatura dada T (°K) es independiente del disolvente y sólo depende de las propiedades del cristal.

$$\ln X_B^i = - \frac{\Delta H^F}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T^F} \right)$$

Ecuación 3

En la ecuación 3,  $\Delta H^F$  es el calor molar de fusión (J/mol), y  $T^F$ , la temperatura de fusión (°K). La solubilidad se expresa en unidades de fracción molar, y la constante de los gases, R, se expresa en J/ (°K mol) unidades SI (**Pardeep K., 2006**).

Para fines prácticos, el valor de  $\Delta H^F$  y el correspondiente a  $X_B^i$ , son indicadores del grado de cohesividad que existe entre las moléculas de un sólido cristalino y representan a la energía necesaria para la transición de la fase sólida a la líquida de un compuesto, por lo que un valor alto de  $\Delta H^F$  en un sólido, supone mayor cristalinidad – orden -, y por lo tanto, menor solubilidad  $X_B^i$ .

No obstante lo anterior, también es sabido que en el proceso de solubilización intervienen no sólo las fuerzas de cohesión del soluto, sino que para que ocurra la disolución del soluto en el disolvente (o mezcla de disolventes), debe existir interacción entre las moléculas del soluto y del disolvente (fuerza de adhesión), lo cual requiere de energía y se expresa como  $\Delta H^M$  (entalpía de mezcla).

Otro factor a considerar en el proceso de disolución es la propia energía que demandan las moléculas del disolvente para su separación ( $\Delta H^D$  entalpía de disolución), de modo que se generen los “espacios o huecos” necesarios para que en su momento, al interaccionar con las moléculas del soluto, éstas puedan ser incorporadas a la matriz de moléculas del disolvente.

Por todo lo anterior, en la predicción de la solubilidad de un soluto, no basta con conocer el valor de  $\Delta H^F$  y la  $X_B^i$ , sino que se requiere estimar también el comportamiento fisicoquímico del soluto en presencia de las moléculas del disolvente; para ello se necesita calcular otras magnitudes termodinámicas del proceso de solubilización como lo son: el  $\Delta H^M$ ,  $\Delta H^S$ ,  $\Delta S^S$  y la energía libre de disolución ( $\Delta G^S$ ).

A su vez, la energía libre de disolución se relaciona directamente con la solubilidad,  $X_B$  de un soluto en un determinado disolvente, porque es una constante de equilibrio (**Bustamante P., 2001**):

$$\Delta G^S = -RT * \ln X_B \quad \text{Ecuación 4}$$

Los valores de la entalpía ( $\Delta H^S$ ) y entropía de disolución ( $\Delta S^S$ ), determinan el signo y la magnitud de la energía libre de disolución ( $\Delta G^S$ ):

$$\Delta G^S = \Delta H^S - T\Delta S^S - \quad \text{Ecuación 5}$$

Para la disolución de sólidos los términos de “disolución” y “mezcla” no son equivalentes, ya que la disolución incluye la etapa de fusión ( $\Delta H^F$ ) y la de la mezcla ( $\Delta H^M$ ), lo cual se expresa mediante las siguientes ecuaciones:

$$\Delta H^S(\text{sólido}) = \Delta H^F + \Delta H^M \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\Delta S^S(\text{sólido}) = \Delta S^F + \Delta S^M \quad \text{Ecuación 7}$$

En resumen, se puede decir que el proceso de mezcla de un soluto con el disolvente para dar lugar a una solución, se puede dividir en dos etapas (**Bustamante P., 2001; Martín A., 1993**):

- a) Las moléculas del soluto vencen las fuerzas cohesivas que las mantienen unidas en el estado sólido y por su parte, las moléculas de disolvente deben separarse suficientemente para crear cavidades donde se acomoden las moléculas de soluto. Esta etapa es endotérmica, ya que necesita un aporte de energía, y su contribución a la solubilidad es desfavorable.
- b) Las moléculas de soluto se incorporan en las cavidades creadas en el disolvente, produciéndose así la solvatación del soluto por el disolvente, la cual se da mediante fuerzas de van der Waals y/o enlaces de hidrógeno. Esta segunda etapa contribuye favorablemente a la solubilidad porque el proceso es exotérmico.

Ambas etapas determinan la magnitud y el signo de la entalpía de mezcla,  $\Delta H^M$ , y de la entropía de mezcla,  $\Delta H^S$ . (**Martin A., 1993; Bustamante P., 2001**).

La disolución de un sólido incluye además, a diferencia de la mezcla de un soluto líquido con un disolvente, un paso adicional: el soluto debe vencer las fuerzas atractivas del cristal; por ello se considera en un primer paso, la fusión del sólido, seguida de la mezcla con el disolvente.

En las ecuaciones 4 y 5, el signo positivo es desfavorable y el signo negativo favorable. Para que el proceso de disolución sea espontáneo, la variación de energía libre debe ser negativa, es decir, la energía la energía libre de disolución debe disminuir. La entalpía de fusión  $\Delta H^F$  es constante e independiente del disolvente. Su signo es siempre positivo, (desfavorable), ya que la fusión requiere la aportación de calor. Sin embargo, esta etapa es posible porque la fusión produce un aumento de entropía,  $\Delta S^F$  (mayor desorden). Por su parte, el signo de la entalpía de la disolución dependerá del valor de las magnitudes termodinámicas de fusión y mezcla (**Bustamante P.; Pardeep K., 2006**).



## 4. TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTALES PARA EVALUAR MATERIALES CRISTALINOS.

### 4.1 Difractometría de rayos X

Hace más de un siglo, en 1895, Wilhelm Konrad Röntgen, científico alemán de la Universidad de Würzburg, Alemania, descubrió una radiación, entonces desconocida y de ahí su nombre de rayos X, que tenía la propiedad de penetrar los cuerpos opacos.

Hoy se sabe que los rayos X son radiaciones electromagnéticas, como lo es la luz visible, o la radiación ultravioleta e infrarroja; lo único que los distingue de las demás radiaciones electromagnéticas es su llamada longitud de onda, que es del orden de 0.1 a 100 Å ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ ) (Jenkis R.; Zinder R. L., 1996). La radiación de rayos X es producida por la desaceleración de electrones de elevada energía o por transiciones electrónicas que implican electrones de orbitales internos de los átomos.

La espectroscopía de rayos X, al igual que la espectroscopía óptica, se basa en la medida de la emisión, absorción, dispersión, fluorescencia y difracción de la radiación electromagnética. Estas medidas dan información muy útil sobre la composición y la estructura de la materia. Estas técnicas no destructivas han evolucionado hasta nuestros días, siendo de gran utilidad para los analistas y cristalógrafos, para la caracterización de materiales no sólo en campos tales como la mineralogía, la metalurgia, la biología, la química estructural, la microelectrónica y el medio ambiente, sino también para el control de numerosos procesos industriales (Soriano M., 2000).

El análisis de polvos representa la aplicación más extendida: el difractograma obtenido después de la irradiación de una muestra con un haz de rayos X, constituye la carta de identidad de esa estructura cristalográfica. La medida precisa de la posición y la intensidad de todos y cada uno de los picos de difracción, permiten determinar la naturaleza y eventualmente la concentración de las diferentes fases cristalinas que constituyen la muestra.

La difracción de rayos X permite asimismo, obtener información de los orígenes del cristal, tales como la textura, las fuerzas residuales, la posición de los átomos dentro de la red cristalina, la caracterización de la formación de las capas cristalinas, etcétera.

Para los laboratorios farmacéuticos el control de calidad de materias primas y formas farmacéuticas exige la aplicación de técnicas analíticas instrumentales, complementarias a las establecidas hasta la actualidad en las farmacopeas, ya que se ha previsto la necesidad de apoyar sus especificaciones con otros análisis que permitan referencias no sólo la pureza de un material, sino también su grado de cristalinidad, que es bien sabido ayuda al desarrollo de las formulaciones, a los procesos de fabricación y a la estabilidad de los productos.

La difracción de los rayos X es una técnica de elección para:

- c) La caracterización y el conocimiento del principio activo.
- d) El seguimiento de su integridad durante su inclusión en la forma farmacéutica y durante los estudios de estabilidad y de envejecimiento.
- e) La identificación rápida de los principios activos o de los excipientes.

Las ventajas para un laboratorio farmacéutico que dispone de esta técnica, se puede mencionar la realización de los siguientes ensayos:

- ❖ Identificación de polimorfos provenientes de distintos sistemas de recristalización o identificación de mezclas de polimorfos en un lote de producción.
- ❖ Estudios de cambios polimórficos y estabilización de polimorfos en presencia de distintos materiales.
- ❖ Identificación de compuestos que presentan isomería óptica (enantiómeros y mezclas racémicas).
- ❖ Identificación y cuantificación de componentes de una mezcla.

- ❖ Identificación de cambios cristalinos que pueden presentarse con el principio activo o excipientes, durante la formación del producto sólido en operaciones tales como la granulación, la liofilización y la compresión, entre otros.

### Emisión de rayos X

Los rayos X para uso analítico se obtienen de tres maneras:

- 1) Por bombardeo de un blanco metálico con un haz de electrones de elevada energía
- 2) Por exposición de una sustancia a un haz primario de rayos X con el objetivo de generar un haz secundario de fluorescencia de rayos X.
- 3) Utilizando una fuente radiactiva cuyo proceso de desintegración da lugar a una emisión de rayos X.

### Ley de Bragg

Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un material cristalino, tienen lugar interferencias, tanto constructivas como destructivas, entre los rayos dispersados, lo cual se debe a que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud de onda de la radiación, y el resultado es la dispersión de la radiación de rayos X.

La ley de Bragg establece que la radiación de rayos X que incide sobre un cristal formando un ángulo  $\theta$ , los átomos del cristal dispersan la radiación de rayos X debido a su arreglo en los diferentes planos cristalográficos. Así ocurre un efecto acumulativo de esta dispersión, producida por los diferentes planos separados por una distancia interplanar característica del conjunto de planos (**Soriano M., 2000**).

Los requisitos para la difracción de rayos X son:

- 1) Que el espaciado entre las capas de átomos sea aproximadamente el mismo que la longitud de onda de la radiación y

2) Que los centros de dispersión estén distribuidos en el espacio de una manera muy regular.

Un haz estrecho de radiación choca con la superficie del cristal con un ángulo de incidencia  $\theta$ ; la dispersión tiene lugar como consecuencia de la interacción de la radiación con los átomos localizados en O, P y R.

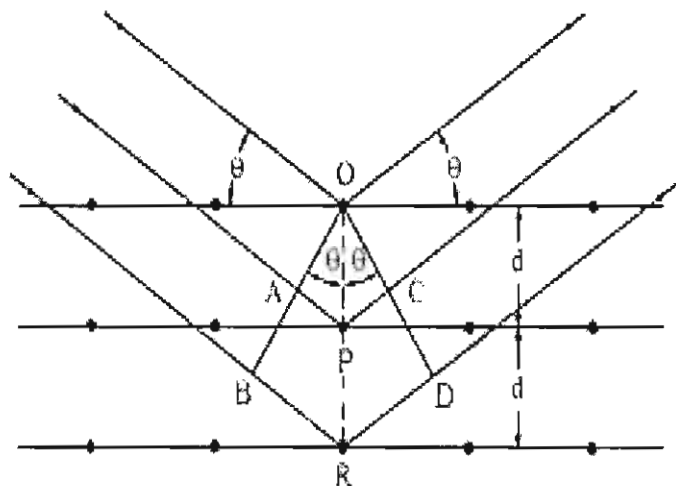


Figura 3. Esquemmatización de la difracción de los rayos X, en una red cristalina, de acuerdo al modelo de Bragg.

Si la distancia

$$AP + PC = n \lambda \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde n es un entero, la radiación dispersada estará en fase en OCD y el cristal refleja la radiación X, pero en realidad se observa que

$$AP = PC = d \text{ sen } \theta \quad \text{Ecuación 9}$$

Debido a que debe ser un número entero de veces  $\lambda$ , entonces para que exista un efecto constructivo, la relación debe cumplirse:

$$2d \text{ sen } \theta = n\lambda \quad \text{Ecuación 10}$$

en donde  $d$  es el espacio interplanar. Que corresponde a la ecuación de Bragg.

Sólo si el ángulo de incidencia de los rayos X satisface la condición:

$$\text{sen } \theta = n\lambda / 2d \quad \text{Ecuación 11}$$

éstos serán reflejados: De otro modo, tendrán lugar interferencias destructivas.

Los componentes de los instrumentos que se usan para la difracción de rayos X, funciona de manera análoga a los cinco componentes de los instrumentos empleados en espectroscopía óptica, aunque difieren considerablemente en cuanto a los detalles: incluyen una fuente de la radiación incidente, un soporte o compartimiento para la muestra, un detector de radiación (transductor), un procesador de la señal y un dispositivo de lectura y medida.

### **Método de monocristal**

#### ❖ Técnica del cristal giratorio

Se utiliza un haz monocromático. Al cristal se le hace oscilar o girar alrededor de un eje, normalmente, es perpendicular al haz de rayos X. El haz de rayos X se mantiene fijo y el detector de la radiación dispersada gira para capturar las intensidades dispersadas por el cristal. El detector es un dispositivo que permite capturar datos rápidamente, los datos son las intensidades dispersadas por el cristal.

#### ❖ Técnica de von Laue

Este método utiliza un cristal fijo pero requiere un espectro blanco o continuo de rayos X. El método puede utilizarse tanto en transmisión, generalmente para ángulos pequeños o en reflexión (método de reflexión de von Laue). Los diagramas permiten obtener información para:

1) Determinar la simetría y la estructura de los materiales

2) Orientación de monocristales

3) Y para investigar la distorsión o la policristalinidad de las muestras

### **Método del polvo cristalino**

Este es un método analítico capaz de proveer información cualitativa y cuantitativa sobre los compuestos presentes en una muestra sólida, y se basa en el hecho de que cada sustancia cristalina presenta un diagrama de difracción único o huella digital.

Para los estudios analíticos por difracción de rayos X, la muestra se fragmenta hasta obtener un polvo fino homogéneo, de forma tal que los numerosos pequeños cristales estén orientados en todas las direcciones posibles y, por tanto, cuando un haz de rayos X atraviesa el material, se puede esperar que un número significativo de partículas estarán orientadas de tal manera que cumplan la condición de Bragg de la reflexión para todos los espacios interplanares posibles (**Surana R., Suryanarayanan R., 2000**).

### **Interpretación de los diagramas de difracción**

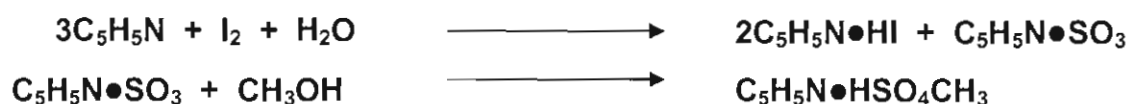
La identificación de especies mediante los diagramas de difracción de polvo cristalino, se basa en la posición de los máximos de intensidad o picos de máxima cantidad de fotones dispersados, en términos de  $2\theta$  o de los espacios interplanares. El ángulo de difracción  $2\theta$  se determina por el espaciado entre un grupo particular de planos, con la ayuda de la ecuación de Bragg, y la distancia  $d$  se calcula a partir de una longitud de onda de la fuente conocida y del ángulo medido. Las intensidades de los picos obtenidos dependen del número y del tipo de centros atómicos de reflexión que existen en cada grupo de planos.

En la actualidad, la difracción de rayos X de polvos cristalinos a temperatura programada, tiene una especial atención en el estudio de materias primas farmacéuticas, ya que entre otras posibilidades, permite detectar transiciones

polimórficas que a veces no son detectadas empleando otras técnicas tales como la calorimetría de barrido.

## 4.2 Contenido de agua

En la actualidad existen varios métodos para la determinación del contenido de agua en una sustancia en estado sólido, líquido o una mezcla de ambas fases. En el ámbito farmacéutico la técnica más utilizada es la Titulación por el método de Karl Fischer. El método se basa en la relación cuantitativa que se produce entre el agua y un reactivo constituido por dióxido de azufre y yodo en piridina anhidra y metanol anhidro, de acuerdo con las siguientes reacciones: (FEUM, 2004)



Después de que el agua reacciona con el yodo libre en la solución, se produce un cambio de color y el punto final de la titulación puede determinarse electrométricamente utilizando un microamperímetro, debido a que se produce una diferencia potencial en el seno de la reacción. La estequiometría de la reacción no es exacta y la reproducibilidad de la reacción depende de factores tales como las concentraciones relativas de los ingredientes del reactivo, la naturaleza del disolvente para disolver la muestra y la técnica utilizada en la determinación específica.

Puede utilizarse cualquier aparato que proporcione una adecuada exclusión de humedad atmosférica y la determinación del punto final de la reacción. Los aparatos comerciales generalmente constan de un sistema cerrado consistente de una o dos buretas automáticas y un vaso de titulación cubierto herméticamente, equipado con electrodos necesarios y un agitador magnético.

### 4.3 Microscopía óptica

El microscopio compuesto combina dos sistemas de lentes convergentes: el objetivo y el ocular, dispuestos en posiciones fijas en los extremos opuestos de un tubo cuya longitud puede ser modificada, con ellos se consigue obtener una imagen real aumentada del objeto de observación, que a su vez se observa a través del ocular como una imagen virtual aun más aumentada. El microscopio óptico tiene un límite de resolución de cerca de 200 nm (0.2  $\mu\text{m}$ ). Este límite se debe a la longitud de onda de la luz (0.4-0.7  $\mu\text{m}$ ).

El objeto a observar se sitúa por lo general en una placa de vidrio que es colocada sobre una platina del microscopio, en esta posición, desde abajo recibe regularmente un haz de luz natural o de una lámpara.

Una parte importante para una adecuada observación de la muestra en un microscopio son los objetivos, los cuales pueden cambiarse y para un trabajo normal, es suficiente disponer de tres objetivos acromáticos: bajo (3.2x ó 4x), medio (10x ó 20x), alto (40x ó 45x).

Uno de los microscopios de gran utilidad en el análisis cristalográfico de las materias primas farmacéuticas, es el microscopio polarizante, ya que permite, mediante una simple observación, definir si un material pulverulento corresponde a un material cristalino o amorfo.

### 4.4 Espectroscopía de absorción al infrarrojo

El espectro de las radiaciones infrarrojas comprende un conjunto de longitudes de onda subdividido con fines prácticos en distintas zonas (cercana, mediana y lejana) cuyos límites son aproximados y respectivamente, 0.8 - 2.5  $\mu\text{m}$  (12500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ); 2.5 - 1.5  $\mu\text{m}$  (4000 a 667  $\text{cm}^{-1}$ ) y 15 - 200  $\mu\text{m}$  (667 a 50  $\text{cm}^{-1}$ ).

Cada una de estas regiones tiene sus propias características de interacción con la materia, y el infrarrojo medio, designado habitualmente como infrarrojo, es el que



mayor campo de aplicación ha tenido en análisis instrumental hasta hace algunos años **(Bugay D. E., 2001)**.

En la mayoría de los casos, las aplicaciones que tiene la espectroscopia infrarrojo (IR) en farmacia, es de índole cualitativa, como es el caso de la comprobación de la identidad, utilizando los debidos estándares de referencia, y por supuesto análisis cuantitativos.

Cabe señalar que la radiación en el infrarrojo, no es lo suficientemente energética para producir la clase de transiciones electrónicas que se dan cuando la radiación es ultravioleta, visible y de rayos X, de modo que la absorción de radiación en el infrarrojo se limita en gran parte, a especies moleculares, para las cuales la absorción de cuantos de radiación ocasiona transiciones de estados energéticos vibracionales y rotacionales.

Para absorber radiación en el infrarrojo, una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. El momento dipolar está determinado por la magnitud de la diferencia de carga y por la distancia entre los dos centros de carga de una molécula. Sólo en estas circunstancias, el campo alterno de la radiación puede interaccionar con la molécula y provocar cambios en la amplitud de alguno de sus movimientos **(Duerst R. W., et al., 1998)**.

Cuando la frecuencia de la radiación coincide exactamente con la frecuencia de vibración natural, tiene lugar la transferencia neta de energía que origina un cambio en la amplitud de la vibración molecular, cuya consecuencia es la absorción de la radiación.

De manera análoga, la rotación de las moléculas asimétricas alrededor de sus centros de masa, puede producir una variación periódica en el dipolo que puede interaccionar con la radiación.

Lo anterior explica que especies homonucleares como el O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> o Cl<sub>2</sub>, presentan momentos dipolares que no sufren un cambio neto durante la vibración o la rotación y como consecuencia, no absorban radiación infrarroja.

Los espectros infrarrojos de los compuestos poliátómicos covalentes, generalmente son muy complejos, ya que constan de numerosas bandas de absorción estrecha, contrastando con los espectros comunes del ultravioleta y visible.

En el campo de la investigación farmacéutica, la espectroscopía infrarroja, tiene gran interés, como método de asignación de estructuras de nuevos compuestos de síntesis orgánica, de modo que es posible relacionar las frecuencias de ciertas bandas de absorción en IR con la presencia de determinados enlaces o grupos funcionales de la molécula.

Mediante el estudio de innumerables compuestos orgánicos y siguiendo distintos métodos de comprobación, con el tiempo ha sido posible asignar a los principales grupos funcionales, bandas de absorción características y establecer cómo, la posición y aún la forma de estas bandas, pueden variar de acuerdo con las condiciones estructurales y electrónicas, y también por cambios en el estado físico o en el disolvente utilizado para preparar la muestra.

Se han establecido los siguientes postulados fundamentales sobre la utilidad de la espectroscopía infrarroja (**Conflat P., 1994**):

- a) Las sustancias orgánicas presentan frecuencias de grupo, características en la región IR.
- b) El espectro de absorción de una sustancia dada, es específico para dicha sustancia, es decir, es posible que dos o más sustancias que tengan los mismos grupos funcionales, presentes espectros muy parecidos, pero en conjunto deben existir varias diferencias que permiten individualizar cada espectro.
- c) El espectro de absorción de mezclas de sustancias, generalmente es aditivo, es decir, corresponde a la suma de los espectros individuales de los componentes.
- d) La intensidad de una banda de absorción está relacionada con la concentración de la sustancia que absorbe la radiación incidente.

La interpretación de los espectros IR requiere no sólo de buenos conocimientos teóricos, sino también de mucho entrenamiento, ya que se debe ser capaz de correlacionar rápidamente posición, forma e intensidad de las bandas, y conjugarlos con los datos químicos que se posean (**Fletton R. A., Harris R. K., et al. 1987**).

De tal forma ha sido posible establecer regiones del espectro que permiten identificar grupos funcionales como en el caso de la zona de frecuencias de grupo, que va de 4000 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde a las vibraciones producidas por sólo dos átomos de la molécula, tales como las vibraciones de tensión de enlaces X-H, - donde X es un átomo tal como C, O, N de peso atómico menos de 19 -, y que ocurren entre 4000 - 2500  $\text{cm}^{-1}$ .

Las bandas propias de triples y dobles enlaces (C=O, C=C, C=N, N=O, etc.) se observan respectivamente, entre 2500 - 2000  $\text{cm}^{-1}$  y 2000- 1500  $\text{cm}^{-1}$

La frecuencia de cada banda del espectro de vibración-rotación molecular depende de la constante de fuerza de cada enlace interatómico y de ahí que los espectros de absorción en la región infrarroja dependan del conjunto de enlaces que constituyen la estructura molecular y sean distintos y característicos de cada molécula.

La región de frecuencias de radiación IR entre 1600 y 650  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde a las vibraciones de tensión de los enlaces simples y a las vibraciones de la estructura molecular de moléculas complejas, tales vibraciones se denominan el esqueleto ya que se extienden sobre el esqueleto molecular total, en lugar de estar localizadas sobre un solo grupo pequeño. Sin embargo, lo más interesante, es que el aspecto del espectro infrarrojo en la región de 1200 a 600  $\text{cm}^{-1}$  es característica para cada molécula, hasta el punto que se considera que no existen dos moléculas diferentes que tengan el mismo espectro en esta región, de ahí que se denomine zona de la huella dactilar de la molécula (**Silverstein R.M., et al., 1991**).

La preparación de las muestras para el análisis por espectroscopia IR es distinta según se trate de una sustancia en estado sólido o líquido y del propósito del ensayo. Las muestras líquidas se colocan por lo general directamente en celdas especiales que

consisten generalmente en dos ventanas de material transparente a la radiación infrarroja - Csl, NaCl, entre otras -, montadas en uno separados metálico que permite variar la distancia entre ellas.

Las muestras sólidas se pueden estudiar en solución, en suspensión - mulls- o en pastilla. Las muestras en solución se preparan por lo general a una concentración aproximada al 1 % y se utilizan celdas similares a las de las muestras líquidas con un espesor de 0.1 mm.

Cuando la muestra se prepara en forma de suspensión en un mortero de ágata, se dispone una mezcla íntima del sólido en polvo previamente desecado, con unas gotas del líquido transparente a la radiación IR - que suele ser Nujol (parafina líquida densa) o Fluorolube (perfluoruro de queroseno)-, hasta conseguir una pasta uniforme. La pasta así obtenida se coloca entre dos láminas de NaCl o de otro material adecuado.

La técnica más utilizada en farmacia para muestras sólidas es la de formación de comprimidos, que consiste en pesar una pequeña cantidad de muestra (alrededor de 1 mg), la cual se seca previamente y se mezcla mediante pulverización en un mortero de ágata, con KBr seco.

La mezcla se comprime con la ayuda de una matriz y punzón de acero templado, en una prensa especial tras extraer el aire por vacío. La presión aplicada puede oscilar por lo regular entre 1418 y 2026 Mpa (140 y 200 Kp/cm<sup>2</sup>). El comprimido resultante se coloca en un soporte para situarla posteriormente en el compartimiento.

Para observar polimorfismo, se recomienda la técnica de suspensión, pero también se ha llegado a utilizar la pastilla de Bromuro de potasio, cuando se demuestra que la fuerza de compactación para obtener la pastilla no produce cambios polimórficos.

Actualmente existe un equipo, con transformadas de Fourier donde la muestra se coloca directamente sobre el lente o elemento de reflexión interna hecho de diamante.

## Instrumentos

El espectrofotómetro utilizado para registrar el espectro en la región infrarroja deberá contar con un sistema óptico o un interferómetro capaz de suministrar radiación monocromática en la región de  $12800\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$  ( $0.8\ \mu\text{m}$  a  $2.5\ \mu\text{m}$ ) para el análisis en el infrarrojo cercano y de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $200\text{ cm}^{-1}$  ( $2.5\ \mu\text{m}$  a  $50\ \mu\text{m}$ ) para el infrarrojo medio.

### 1) Instrumentos Dispersivos

Los componentes básicos del espectrofotómetro de un solo haz y de doble haz tiene fuente de radiación infrarroja, porta celda, sistema monocromador (que consiste de rejilla de entrada, colimador, prisma o rejilla de difracción, rejilla de salida, segundo sistema de lentes o espejos), sistema de detección, amplificador, atenuador y registrador.

### 2) Instrumentos No Dispersivos (FTIR)

La espectroscopia en el infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR) es hoy la técnica moderna no dispersiva de preferencia, se aplica en el análisis cualitativo y cuantitativo de especies moleculares de todo tipo (**Donoso M., Ghaly E., 2004**). Se manejan muestras cada vez más pequeñas ( $1\text{ mg}$  a  $2\text{ mg}$ ) y complejas como los polvos, muestras acuosas y muestras opacas. La sensibilidad, resolución y exactitud de onda absoluta, superan a los instrumentos dispersivos. Los componentes principales son Fuentes de radiación (Filamentos de Nernst, Fuente Global, Tira de Nicromo), Interferómetro (De Micheñson o de Péndulo), Detector y Procesador de datos.

## 4.5 Espectrofotometría visible y ultravioleta

La espectrofotometría se basa en la medida de la absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática. La banda espectral utilizada en las mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta de la zona ultravioleta hasta la visible del espectro.

La identificación cualitativa de los compuestos orgánicos en esta región está mucho más limitada que en la del infrarrojo. Sin embargo, ciertos grupos funcionales, como el carbonilo, el nitro y los sistemas conjugados presentan picos característicos y se puede obtener información útil con respecto a la presencia o ausencia de esos grupos en la molécula.

### **Absorción de luz**

Cuando la luz de una longitud de onda particular pasa a través de una solución diluida en un contenedor apropiado tales como celdas de cuarzo, vidrio o plástico, la luz puede interactuar con la materia por diferentes vías. Una porción de la luz es absorbida y el resto pasa sin efecto pero redireccionada. La energía absorbida a su vez puede ser emitida con longitudes de onda bajas y este proceso es conocido como emisión. En espectroscopia UV-Visible, la absorción depende de la estructura química de los constituyentes de la solución y permite la cuantificación a través de la relación conocida como ley de Lambert – Beer. Lo anterior tiene múltiples aplicaciones en sistemas farmacéuticos entre ellos la determinación del contenido del principio activo en soluciones.

### **4.6 Análisis térmicos**

Este tipo de análisis permite obtener información sobre propiedades y transformaciones físicas y químicas de una muestra cuando es sometida a variaciones de temperatura en una atmósfera específica, como pueden ser: características de los cristales, transformaciones polimórficas, transición vítrea, temperatura y calor específico de transición y de fusión, fenómenos de sublimación e interacciones sólido-sólido.

La medición instrumental de estos fenómenos tiene la ventaja de poseer alta sensibilidad, precisión y exactitud.

El análisis térmico permite la identificación, control de pureza y estabilidad de las sustancias, ya que las transiciones de estado ocurren a temperaturas características.

Las técnicas de análisis térmico que se emplean con mayor frecuencia son: la calorimetría diferencial de barrido (DSC), el análisis térmico diferencial (ATD), el análisis termogravimétrico (ATG) y el análisis termomecánico (ATM).

Las propiedades medidas para cada técnica se indican en el siguiente cuadro:

<b>TÉCNICA</b>	<b>PROPIEDAD MEDIDA</b>
DSC	Flujo de calor, cambio de energía
ATD	Diferencia de temperatura
ATG	Masa, peso
ATM	Deformación

#### **4.6.1 Calorimetría diferencial de barrido**

Este análisis mide la absorción o desprendimiento de calor producido durante el calentamiento o enfriamiento de una muestra (procesos químicos), o durante el mantenimiento de la misma a una temperatura fija (proceso isotérmico), detectando cualquier fenómeno (transiciones físicas o reacciones químicas) acompañado por una entalpía (**Chong H. G., Grant D. J., 2001**).

Cuando un sólido cristalino funde, la temperatura se mantiene constante por un momento, aún y cuando se suministre más calor, se mantiene constante hasta que todo el sólido haya fundido completamente. Luego, la temperatura del sólido comienza a ascender nuevamente. El aumento se detiene porque la fusión requiere energía. Toda la energía que se agregue a un sólido cristalino en su punto de fusión, se utilizará en la fusión y no en un aumento ulterior de la temperatura. Este calor se denomina calor latente de fusión.

Una vez que el sólido fundió, la temperatura comienza a ascender de nuevo, pero ahora a una velocidad más lenta. El sólido fundido tiene mayor capacidad calorífica que el cristal en estado sólido, de modo que puede absorber más calor con incrementos de temperatura más pequeños.

Cuando un sólido cristalino funde, ocurren dos cosas: absorbe una cierta cantidad de calor - el calor latente de fusión -, y experimenta un cambio en su capacidad calorífica. Cualquier cambio debido al calor, ya sea fusión o congelamiento, ebullición o condensación, que involucre un cambio en la capacidad calorífica y un calor latente, se denomina transición de primer orden (**Clas S. D., Hancock, 2002**).

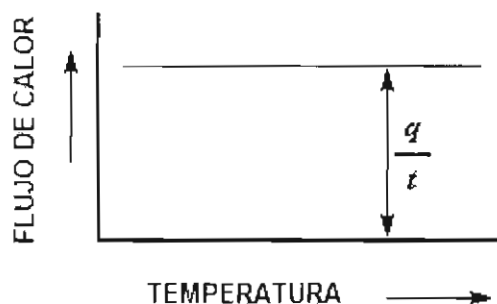
El análisis de la muestra se realiza con un calentamiento en un horno, provisto de un sensor altamente sensible, que permite medir la diferencia entre los flujos de calor, sobre ellos se coloca un crisol que contiene la muestra y un crisol de referencia, el cual se deja vacío. Cada platillo se apoya sobre la parte superior de un calefactor. Una computadora acoplada pone en funcionamiento los calefactores. La velocidad de calentamiento debe ser exactamente la misma a lo largo de todo el experimento, por otra parte los calefactores deben calentarse a la misma velocidad.

Los dos platillos son diferentes, uno contiene muestra y el otro no. La muestra sólida implica que hay material extra en el platillo de la muestra. Tener material extra significa que hará falta más calor para lograr que la temperatura del platillo de la muestra aumente a la misma velocidad que la del platillo de referencia. De modo que el calefactor situado abajo del platillo de la muestra, debe trabajar más intensamente que el calefactor que está abajo del platillo de referencia, tiene que suministrar más calor. En un experimento de DSC, se mide cuánto calor adicional debe suministrarse.

### **Capacidad Calorífica**

Al calentar los dos platillos, la computadora registra la diferencia de producción de calor entre los dos calefactores versus temperatura. Esto significa que se grafica el calor absorbido por el sólido en función de la temperatura. Al principio, la curva se verá así:





El flujo de calor es expresado en unidades de calor  $q$ , suministrado por unidad de tiempo,  $t$ . La velocidad de calentamiento es el incremento de temperatura  $T$ , por unidad de tiempo,  $t$ .

$$\frac{\text{CALOR}}{\text{TIEMPO}} = \frac{q}{t} = \text{FLUJO DE CALOR}$$

$$\frac{\text{INCREMENTO DE TEMPERATURA}}{\text{TIEMPO}} = \frac{\Delta T}{t} = \text{VELOCIDAD DE CALENTAMIENTO}$$

Al dividir el flujo de calor  $q/t$  por la velocidad de calentamiento  $T/t$ , tendremos calor suministrado dividido por el incremento de temperatura.

$$\frac{\frac{q}{t}}{\frac{\Delta T}{t}} = \frac{q}{\Delta T} = C_p = \text{CAPACIDAD CALORÍFICA}$$

La capacidad calorífica se obtiene al dividir el calor suministrado por el incremento resultante de temperatura a partir del gráfico de DSC.

Además, otras de las características de los gráficos, dado que el sólido entrega calor cuando cristaliza, decimos que la cristalización es una transición exotérmica. Cuando se suministra energía para que el sólido funda, la fusión es una transición endotérmica. La depresión que forma la cristalización y el pico de fusión sólo aparece en los sólidos capaces de formar cristales.

Los métodos térmicos diferenciales han encontrado amplia utilización en la industria farmacéutica para analizar la pureza de los principios activos, el punto de fusión y la existencia de posibles polimorfos.

#### 4.7 Velocidad de disolución intrínseca

La información acerca de las características de solubilidad y permeabilidad del fármaco, son la base del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.

De acuerdo a los lineamientos de la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA), un fármaco es "altamente soluble" si la dosis mayor recomendada se disuelve en un volumen no mayor a 250 mL de un medio acuoso (CDER/FDA, 2000).

Por otra parte Yu y Amidon propusieron basar la clasificación de la solubilidad de un fármaco, en la constante de velocidad intrínseca, la cual presenta una mejor correlación con la dinámica del proceso de disolución in vivo (Yu L., et al., 2004).

La velocidad de disolución intrínseca se define como: "la velocidad de disolución de sustancias puras por unidad de tiempo bajo condiciones de área superficial constante" (Abdou H. M., 1989). Para determinar la velocidad de disolución intrínseca se comprime un fármaco bajo condiciones de alta presión en ausencia de excipientes. El disco no desintegrable se transfiere a alguno de los aparatos de disolución, entre los cuales el aparato de Wood (disco rotatorio) es el más actualizado (Abdou H. M., 1989).

#### 4.7.1 Teorías de disolución

Las teorías de la disolución se han generado a partir de modelos que consideran las siguientes condiciones:

- a) La disolución de una partícula única de forma esférica, de un compuesto puro.
- b) El volumen del disolvente es entre cinco y diez veces mayor al de la saturación; es decir, que la solución final es infinitamente diluida. Esta condición se denomina de "penetrabilidad" (Sink, en el idioma inglés). Estas condiciones permiten la obtención de expresiones sencillas mediante las cuales se puede cuantificar el proceso cinético, a través de la denominada "constante de disolución". (Cuando un proceso de disolución implica una reacción química, formación de complejos o alguna otra clase de interacción, las ecuaciones del modelo original de disolución llegan a ser más complejas, al incluirla o las variables adicionales que están integradas al proceso de disolución **(Higuchi T., 1958)**).

Al día de hoy, las teorías de disolución más conocidas son:

- ❖ Teoría de la capa estacionaria o de difusión. (Nerst y Brunner, 1904)
- ❖ Teoría de la renovación superficial o de penetración. (Dankwerst, 1951)
- ❖ Teoría combinada de Nerst-Dankwerst. (Toor y Marchelo, 1958)
- ❖ Teoría de la velocidad limitada de solvatación o de doble barrera. (Nedich y Kildsig, 1972).

#### Velocidad de Disolución

Se define como la cantidad de fármaco que se disuelve por unidad de tiempo bajo condiciones estandarizadas de la interfase líquida/sólida, la temperatura y la composición del solvente.

En 1897 Noyes y Whitney, estudiando la disolución de sólidos en sus propias soluciones y en condiciones de superficie constantes, desarrollaron una ecuación empírica para explicar los resultados de disolución de sus estudios:

$$\frac{dC}{dt} = K_s(C_s - C_t)$$

donde:

$dC / dt$  = Velocidad de disolución del soluto.

$K_s$  = Constante de proporcionalidad, denominada constante de disolución

$C_t$  = Concentración del soluto al tiempo t, en el seno de la solución  
(concentración diluida)

$C_s$  = Concentración de saturación del sólido

Esta ecuación establece que la velocidad de disolución, es directamente proporcional a un gradiente de concentración y la constante k, es característica de un sistema o condiciones dadas de disolución (temperatura, agitación, forma del recipiente, coeficientes de difusión).

Posteriormente, el área superficial S, del soluto fue incorporada a la ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = K_s S(C_s - C_t)$$

La ecuación de Noyes - Whitney, puede ser analizada desde el punto de vista de la primera Ley de Fick de la difusión (**Chan H. K., Grant D. J., 1989**):

$$\frac{DW}{dt} = -DS \frac{dC}{dx}$$

Ecuación de Noyes - Whitney modificada por Underwood y Cadwallader (1978).

$$\frac{dM}{dt} = -kA(C_s - C)$$

donde:

M = masa de sustancia remanente para ser disuelta

A = área superficial del fármaco expuesta al medio de disolución

C<sub>s</sub> = concentración de disolución (solubilidad)

C = concentración del fármaco en el medio al tiempo t

k = constante de velocidad de disolución intrínseca

Ecuación de la Condición "Sink" o de drenado:

Las condiciones "Sink" existen cuando el volumen del medio de disolución es de 5 a 10 veces mayor que el volumen requerido para hacer una solución saturada de un fármaco ( $C < 0.15C_s$  o  $C \ll C_s$ ).

Por lo tanto,

1)  $\frac{dM}{dt} = -kA(C_s - C)$

2)  $\frac{dM}{dt} = -kAC_s$

3)  $\frac{dM}{dt} = -kAC_s$

Generalmente, la velocidad de disolución aumenta cuando:

- ❖ aumenta la constante de velocidad
- ❖ aumenta el área superficial A
- ❖ aumenta la solubilidad C<sub>s</sub>

Manteniendo A y Cs constantes, la velocidad de disolución se puede determinar adecuadamente

La constante de velocidad de disolución intrínseca, k, varía de fármaco a fármaco y es una función del coeficiente de disolución, D (cm<sup>2</sup>/s) del fármaco y el espesor de la película líquida, l (cm).

$$\frac{k}{l} = D \text{ cm.s}^{-1} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Si se aumenta la intensidad de agitación, el espesor de la película disminuye progresivamente. Por lo tanto, k es entonces una función de la prueba.

Disolución es el proceso mediante el cual una sustancia sólida entra en un solvente para dar como resultado una solución o simplemente es el proceso durante el cual una sustancia sólida se disuelve.

La determinación de los parámetros termodinámicos asociados con la fase de transición cristalina, investigación de transferencia de masa durante los procesos disolución, determinación del pH para los perfiles de disolución, el estudio de surfactantes y efectos de pH sobre la solubilización de fármacos pobremente solubles y el conocimiento de la relación entre el perfil de disolución y la forma cristalina son unos pocos ejemplos de uso de la velocidad de disolución intrínseca (**Wadke and Reier, 1972; Deahlan et al., 1987;; Jinno et al., 2000**).

# ***PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA***

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La testosterona es un andrógeno derivado de la androsterona. Este fármaco se emplea frecuentemente en terapia de reemplazo para hombres que tienen síntomas de climaterio o en jóvenes con hipogonadismo (Síndrome de Klinefelter). Otros usos terapéuticos son: el tratamiento en adolescentes donde el desarrollo de sus características masculinas adultas se ha visto retrasado, en terapia para pacientes con hipopituitarismo y en la enfermedad de Addison, en el tratamiento de la frigidez y ocasionalmente en el trastorno de la impotencia. Algunas veces se utiliza como promotor de hematopoyesis (**Goodman A., 1993**).

Por otra parte se ha informado que la combinación de testosterona con estrógenos puede llevar a una terapia eficaz en el tratamiento de la menopausia, ya que los efectos anabólicos tienen ciertos beneficios en personas en etapa de postclimaterio, como el retardar la osteoporosis. La testosterona y sus compuestos relacionados tienen también una amplia aplicación en el tratamiento de cáncer de mama y son usados en el tratamiento de la dismenorrea y la endometriosis (**Guyton A., 2001**).

Así pues, toda vez que la testosterona ha demostrado su alto potencial como agente terapéutico en el tratamiento de muchas disfunciones, y que su patente ha vencido para entrar entonces en la categoría de genérico, se puede observar la pertinencia de generar formulaciones con testosterona que se adecúen a las necesidades posológicas de los pacientes. Lo importante de ésta y otras terapias con hormonas, es dar la dosis mínima necesaria con efecto terapéutico, puesto que el uso de hormonas a largo plazo muchas veces deriva en cambios metabólicos importantes y en casos extremos, en cáncer (**Jackson J. V., Moss M., Widdop B., 1989**).

Como la testosterona es un fármaco de poca solubilidad acuosa y se tiene notificado que es capaz de existir en forma anhidra y en diversas fases cristalinas hidratadas, en este proyecto de investigación se pretendió establecer los parámetros fisicoquímicos del medio o sistema de cristalización, que permitirían obtener la fase cristalina – polimorfo – monohidratada menos soluble en agua, y en condiciones de cristalización que fueran factibles de escalar a niveles de producción.



De tal forma, al obtenerse de manera reproducible, una sola forma polimórfica monohidratada de testosterona poco soluble, será posible disponer de una materia prima de testosterona que en el futuro podrá ser utilizada para diseñar una forma farmacéutica de liberación controlada –como una suspensión por ejemplo-, donde dicha forma cristalina del fármaco fungirá como reservorio en la dosificación.

# ***HIPÓTESIS***

## **6. HIPÓTESIS**

Mediante el control de las condiciones del sistema de cristalización de la testosterona, se determina la fase cristalina y las propiedades fisicoquímicas del sólido así obtenido.

# ***OBJETIVOS***

## 7. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones del medio de cristalización que permitan obtener un polimorfo monohidratado de testosterona que sea factible de formularse en una forma farmacéutica de liberación controlada en suspensión.

### 7.1 Objetivos particulares

- ❖ Establecer, mediante el estudio de distintos medios disolventes y condiciones de cristalización en solución, los parámetros fisicoquímicos del medio para obtener lotes de polimorfos de testosterona, reproducibles en fase y hábito cristalino.
- ❖ Identificar mediante distintas técnicas instrumentales, el hábito y el polimorfismo de los cristales obtenidos para seleccionar el monohidrato de testosterona de interés.
- ❖ Establecer mediante calorimetría diferencial de barrido y con el apoyo de ecuaciones como la de van't Hoff, las magnitudes termodinámicas que identificarán la(s) fase(s) cristalinas obtenidas.
- ❖ Establecer la solubilidad y las magnitudes termodinámicas del proceso de solubilización en agua y mezclas disolventes, de las distintas fases cristalinas en estudio.
- ❖ Determinar la velocidad de disolución intrínseca de cada polimorfo obtenido, comparando los resultados con la testosterona anhidra.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Reactivos

Etanol grado reactivo (R.A), Fermont  
Acetona HPLC, Fermont  
Metanol HPLC, Fermont  
Agua purificada  
Ácido clorhídrico R.A., Fermont  
Agua bidestilada obtenida en el laboratorio  
Testosterona, estándar de referencia USP  
Testosterona materia prima, (Diosynth)  
Indio, estándar de referencia Sigma  
Estaño, estándar de referencia Sigma

### 8.2 Equipo

Vasos reactor de vidrio encamisados de 1000 mL, de fondo plano con 2 bocas, una central 29/32 y una lateral 14/23, con tapones.  
Equipo de vidrio de filtración a vacío con embudo de vidrio para membrana de 47 mm de diámetro y matraz Kitazato de 1000 mL de capacidad.  
Parrilla de agitación magnética  
Sistema de control de temperatura para enfriamiento y calentamiento con recirculación de agua, marca Lauda.  
Espectrofotómetro UV-VIS, marca Hewlett Packard modelo 8453.  
Espectrofotómetro IR, marca Perkin Elmer modelo Spectrum  
Difractómetro de rayos X para monocristales marca Bruker, modelo Smart-Apex II Sheltxl Versión 6.12  
Difractómetro de rayos X para polvos, Bruker modelo AXS-D8  
Calorímetro diferencial de barrido (DSC), de celda estándar, con procesador de datos y sistema de evaluación de parámetros térmicos tipo TA-Q100, software V9.0 Build 275.  
Balanza marca Mettler modelo AE-260  
Prensa para crisoles de aluminio para DSC, TA Instruments

Disolutor de 6 plazas VankeL, modelo VK700 con baño de agua y monitor de control de temperatura, VankeL modelo VK750-D.

Dispositivo de disolución intrínseca de acero inoxidable, Vankel.

Microscopio óptico Marca Nikon modelo Labophot2.

Baño de ultrasonido Branson, modelo 2200.

Microbalanza Marca Mettler/Toledo modelo UMT2

Karl Fischer Marca Mettler Toledo modelo DL31

Material de vidrio de uso común en los laboratorios de análisis.

### **8.3 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA DE REFERENCIA DE TESTOSTERONA**

Las pruebas realizadas fueron las descritas por la USP 29, y se mencionan a continuación:

- ❖ Descripción
- ❖ Identificación
- ❖ Pérdida por secado
- ❖ Impurezas orgánicas volátiles
- ❖ Valoración

### **8.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA, PARA LOS ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD DE TESTOSTERONA.**

#### **8.4.1 Preparación de la muestra**

##### a) Materia prima de referencia

Se transfirió el equivalente a 10.0 mg de testosterona, exactamente pesados a un matraz volumétrico de 50-mL. Se disolvió y llevó a volumen con metanol calidad HPLC. La concentración aproximada de testosterona fue de 0.20 µg/mL.



b) Muestras del estudio de solubilidad de testosterona

El muestreo de cada solución problema de testosterona se realizó con una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro tipo HVLP o un filtro con membrana Whatman de 0.7  $\mu\text{m}$  GF/F w/GMF. Se realizó la determinación de densidad a cada una de las muestras.

Posteriormente, se transfirió la alícuota correspondiente de la solución a analizar, a un matraz volumétrico de 10, 15 ó 25 mL, hasta obtener una concentración de testosterona en el intervalo de trabajo de 5.0 a 35.0  $\mu\text{g/mL}$ . Se disolvió y llevó a volumen con metanol calidad HPLC.

#### **8.4.2 Especificidad a la membrana de extracción**

Se evaluó al procesar por duplicado muestras de agua con calidad HPLC y una mezcla de disolventes etanol:agua (50:50 hasta la proporción 90:10), filtradas con membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro tipo HVLP y membranas Whatman de 0.7  $\mu\text{m}$  GF/F w/GMF. Las muestras se prepararon al 100% p/v y se analizaron con el método propuesto.

#### **8.4.3 Linealidad del sistema**

Se evaluó al determinar la relación que existe entre la concentración "X" y la respuesta "Y" (absorbancia), al preparar una curva con 5 niveles y 3 réplicas por nivel, a partir de pesadas independientes, en el intervalo de concentración de 5.0 a 35.0  $\mu\text{g/mL}$  de testosterona, correspondientes al 25.0% y 175.0%, el 100% corresponde a 20  $\mu\text{g/mL}$  de testosterona, cabe mencionar que el intervalo se planteo siguiendo el método de identificación descrito en la USP.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, derterminándose los siguientes parámetros:

- ❖ La ordenada al origen (A), la pendiente (B), el coeficiente de determinación y su gráfica respectiva.

- ❖ El error estándar de la pendiente (no debe ser mayor al 3.0% de CV).
- ❖ Intervalo de confianza al 95% para la ordenada al origen y para la pendiente.
- ❖ No. de datos, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del factor respuesta (absorbancia/concentración).

#### **8.4.4 Precisión del sistema**

Se evaluó al preparar por sextuplicado soluciones del nivel de 100% de testosterona, a partir de pesadas independientes y analizando por espectroscopia UV.

Se calculó el promedio, desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación (C.V.) de la absorbancia de la testosterona.

#### **8.4.5 Linealidad del método**

Se evaluó la linealidad del método al determinar la relación que existe entre los  $\mu\text{g/mL}$  adicionados y los  $\mu\text{g/mL}$  recuperados, preparando una curva de 3 niveles con 3 réplicas a partir de pesadas independientes, en el intervalo de concentración de 5.0 a 35.0  $\mu\text{g/mL}$  de testosterona.

Se calculó los  $\mu\text{g/mL}$  recuperados de testosterona y se expresaron como porcentaje recuperado respecto a la cantidad teórica adicionada.

Se calculó para cada nivel el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del porcentaje recuperado.

A partir de los datos de  $\mu\text{g/mL}$  adicionados y los  $\mu\text{g/mL}$  recuperados de testosterona, se obtuvo:

- ❖ La ecuación de la recta, pendiente, ordenada al origen, pendiente relativa, ordenada relativa y coeficiente de determinación  $r^2$ .
- ❖ El intervalo de confianza al 95% de significancia para la ordenada al origen y para la pendiente de la recta.
- ❖ El intervalo de confianza al 95% de significancia del porcentaje recuperado para todos los niveles.

#### **8.4.6 Exactitud del método**

Se realizó analizando 6 réplicas del nivel de 100% de testosterona y se calculó el porcentaje recuperado, número de datos (n), promedio, desviación estándar (D.E.), coeficiente de variación (C.V.) y el intervalo de confianza al 95%.

#### **8.4.7 Precisión del método**

##### a) Repetibilidad

Se evaluó utilizando las mismas muestras del experimento de exactitud del método.

Se calculó el porcentaje recuperado de testosterona, número de datos (n), el promedio, desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.).

##### b) Intervalo

Se determinó el intervalo de trabajo, en el cual se demostró que se cumple con los criterios de linealidad, exactitud y precisión del método.

#### **8.4.8 Robustez**

##### a) Estabilidad analítica de la muestra

Se evaluó al almacenar 3 de las muestras preparadas para el experimento de exactitud a temperatura ambiente en condiciones normales de luz y oscuridad; analizando con el método propuesto a las 0, 24 y 48 horas. Se cuantificó con respecto a una curva patrón recién preparada en cada tiempo de análisis.

Se calculó la diferencia absoluta entre el promedio del porcentaje recuperado para testosterona en cada condición de análisis con respecto al promedio del porcentaje recuperado en el tiempo cero.

## 8.5 OBTENCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIMORFOS DE TESTOSTERONA MONOHIDRATADA.

### A) Obtención de los polimorfos I y II

Los polimorfos monohidratados I y II de testosterona, se obtuvieron tomando como referente la información publicada por Kang I. P., (1974), utilizando una muestra de testosterona comercial. No obstante, en este trabajo se propuso la utilización de un procedimiento de recristalización y el empleo de mezclas de distintos disolventes, teniendo como condición que para ambos casos, que el sistema fuera factible de escalar a nivel industrial, considerando asimismo un bajo impacto ambiental.

**Polimorfo I:** En un vaso reactor encamisado se disolvieron 15 g de testosterona en 200 mL de la mezcla de disolventes acetona:agua (90:10). La suspensión se calentó a 45°C para solubilizar el sólido y se dejó equilibrar durante 2 horas. Posteriormente, se descendió la temperatura hasta -1°C manteniendo una agitación constante (entre 400 a 450 rpm) para obtener los cristales. Estos se filtraron con membrana de 0.45 µm aplicando vacío y se realizó un lavado con agua bidestilada fría. Los cristales se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente sobre pentóxido de fósforo durante 15 horas.

**Polimorfo II:** Se sigue el mismo procedimiento que para el polimorfo I, sólo que una vez terminado el periodo de desecación de 15 horas, los cristales se sometieron a una temperatura de 55°C.

### b) Identificación de los polimorfos

Las técnicas analíticas empleadas para la identificación de la fase y hábito cristalino fueron: microscopía óptica, espectroscopia infrarroja, difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido, ensayos de solubilidad y velocidad de disolución intrínseca por la técnica de Wood.

El procedimiento utilizado para el análisis de las muestras se especifica en la descripción de cada técnica analítica.

### **8.5.1 Contenido de agua**

*Preparación de la muestra.* Se colocaron aproximadamente 150 mg de la muestra correspondiente sin algún tratamiento previo, en el vaso del equipo y se realizó la determinación.

*Procedimiento.* La cuantificación de la presencia de agua en las muestras de testosterona anhidra y sus monohidratos, se realizó para cada muestra por triplicado, por el método de Karl-Fischer (**FEUM, 2004**).

### **8.5.2 Microscopía óptica con luz transmitida**

*Preparación de la muestra.* Con ayuda de un pincel fino, se tomó una muestra de unos pocos cristales, los cuales se dispersaron en un portaobjetos de vidrio.

*Procedimiento.* La observación de las muestras se realizó directamente bajo el microscopio, empleando objetivos de 2.5x, 10x, 20x y 40x, según el caso y con una cámara colocada como dispositivo en el microscopio se tomaron las fotografías.

### **8.5.3 Espectroscopía al infrarrojo**

*Preparación de la muestra.* Se colocó aproximadamente de 1 a 3 mg de muestra en el accesorio de Reflectancia Total Atenuada (ATR) del equipo y se realizó el registro.

### **8.5.4 Difractometría de rayos X**

#### **❖ Método para monocristales**

*Preparación de la muestra para difractometría de monocristales.* Se colocó un cristal previamente seleccionado en la cabeza del goniómetro. Se utilizó un haz monocromático. Al cristal se le hizo oscilar o girar alrededor de un eje, perpendicular al haz de rayos X.

*Procedimiento.* El equipo utilizado emplea una radiación de  $K\alpha$  del cobre, que presenta una longitud de onda de 1.5418 Å. Se ajustó a un potencial de 40KV y una intensidad de 40 mA. El registro del difractograma se realizó a una velocidad de barrido de 2° por min. El intervalo de medida fue de  $2^\circ\theta$  a  $80^\circ\theta$ .

❖ **Método para polvos**

*Preparación de la muestra para difracción de polvos.* Se colocaron alrededor de 500 mg de cada muestra, en el portamuestras del equipo, tratando de eliminar las partículas más grandes.

*Procedimiento.* El equipo utilizado emplea una radiación de  $K\alpha$  del cobre, que presenta una longitud de onda de 1.5418 Å. Se ajustó a un potencial de 40KV y una intensidad de 40 mA. El registro del difractograma se realizó a una velocidad de barrido de 2° por min. El intervalo de medida fue de  $2^\circ\theta$  a  $80^\circ\theta$ .

**8.5.5 Calorimetría diferencial de barrido**

*Preparación de la muestra.* Una cantidad de muestra exactamente pesada de alrededor de 3 a 7 mg, se colocó en un crisol de aluminio, se cerró con ayuda de una prensa del equipo. Se colocó en el horno del equipo, en el sensor correspondiente a la muestra (exoterma Up) del calorímetro.

*Procedimiento.* El equipo fue calibrado previamente con estándar de Indio (temperatura de fusión 155.6 a 157.6°C) y Estaño (temperatura de fusión 230.9 a 232.9°C). La velocidad de barrido fue de 8°C por minuto y el intervalo de temperatura por muestra fue de 35° a 200°C. La temperatura y calor de fusión de las muestras se obtuvieron a través de la integración de los eventos detectados (endotermas y exotermas), mediante el programa establecido por el mismo equipo.

**8.5.6 Ensayo de disolución intrínseca por la técnica de Wood**

El dispositivo de disolución intrínseca empleado corresponde al diseño de Wood y col., así como las especificaciones descritas en la USP XXVII.

El material con que está construido el equipo es de acero inoxidable y una placa de acero templado para soportar la presión de compresión de la muestra.

*Preparación del comprimido de la muestra.* Se pesó alrededor de 200 a 250 mg de la muestra a analizar y se transfirió al dispositivo de disolución. Se colocó el punzón de compresión y se llevó a comprimir en una prensa adaptada para el equipo. La presión ejercida fue de 1000 lb/pulg<sup>2</sup>.

Se liberó la cara inferior del comprimido retirando la placa de acero templado al quitar los tornillos que la ajustaban a la matriz. Se eliminó cualquier resto de polvo, proveniente de la compresión.

La matriz conteniendo el comprimido de la muestra, con una sola cara expuesta, se insertó en el eje de rotación para posteriormente colocar éste en el equipo de disolución. (Figura 4).

El medio de disolución empleado fue ácido clorhídrico 0.1N, a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

*Procedimiento.* El ensayo se realizó a una velocidad de rotación de  $50 \pm 2$  rpm, dejando expuesta la cara del comprimido en 900 mL de medio de disolución. El área superficial de la tableta expuesta al medio de disolución fue de  $0.5 \text{ cm}^2$ .

Los muestreos se realizaron tomando alícuotas de 10 mL de manera automática. Los tubos de muestreo colocados en la parte que estaba en contacto con el medio de disolución, estaban provistos de un filtro de membrana de  $0.45 \mu\text{m}$  de diámetro de poro. En cada muestreo se retornó el volumen de la muestra al vaso de disolución.

Las muestras se tomaron cada 5 minutos hasta los 120 min, la cantidad disuelta de testosterona se determinó utilizando un método espectrofotométrico previamente validado. Los datos obtenidos se graficaron en  $\mu\text{g/mL}$  del compuesto disuelto acumulado en función del tiempo transcurrido. El valor de la constante de velocidad de disolución intrínseca ( $k$ ), se calculó mediante el ajuste de los datos de disolución, normalizados por el área de superficie, y utilizando la ecuación de Noyes Whitney.

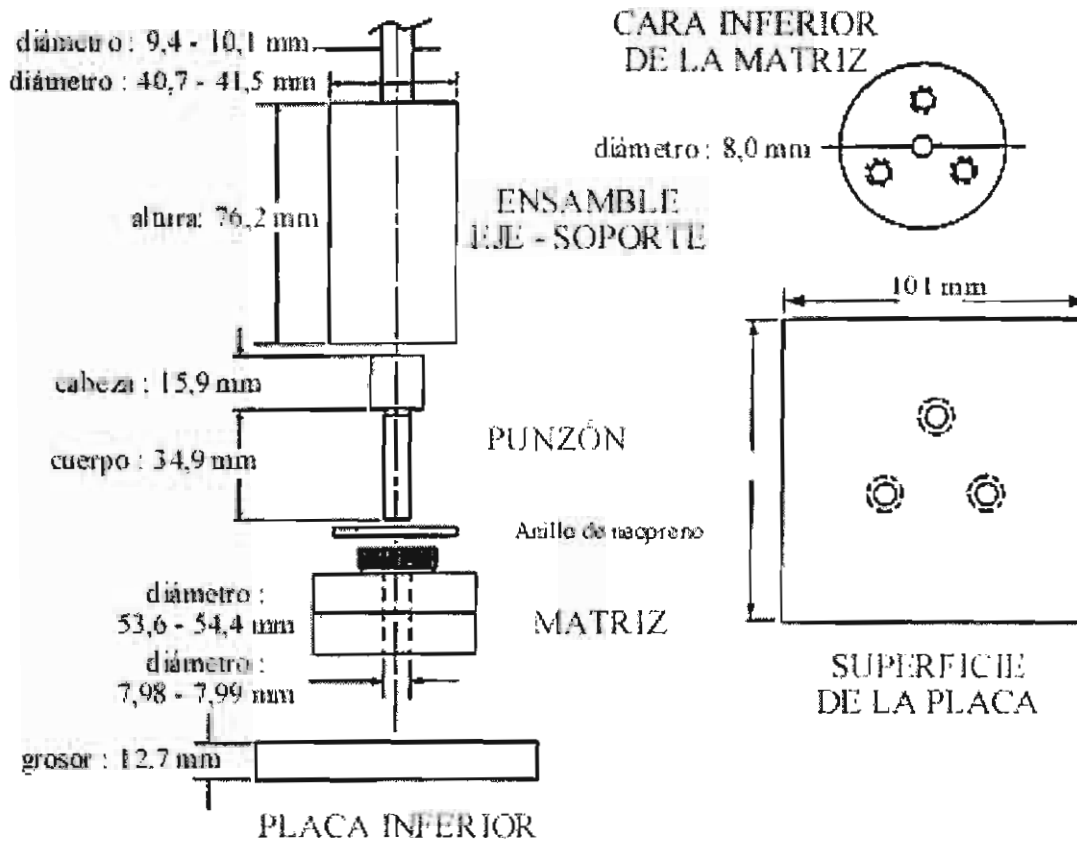


Figura. 4. Esquema que ilustra las características del dispositivo de disolución intrínseca empleado en este estudio y que cumple con las especificaciones de la USP.

## 8.6 OBTENCIÓN DE CURVAS DE SATURACIÓN DE TESTOSTERONA EN DISTINTOS SISTEMAS DISOLVENTES.

### a) Preparación de sistemas de saturación

Se elaboraron curvas de saturación de testosterona anhidra en agua y mezclas de etanol:agua y acetona:agua, en las proporciones de (50:50) hasta (90:10), a las temperaturas de 15°, 20° 35° y 45°C, para cada mezcla, en el caso de testosterona anhidra en sistema acuoso se utilizó también la temperatura de 55°C.



Cada sistema de disolventes junto con un exceso de soluto en dispersión, se mantuvo en agitación continua por medio de una barra magnética colocada en el fondo de un recipiente de vidrio provisto de una camisa para conservar la temperatura constante, lo cual se logró por la recirculación de agua proveniente de un baño de agua termostatzado.

La verificación continua de la temperatura en el sistema se efectuó con termopares que fueron colocados directamente en contacto con el sistema en disolución.

La determinación de la concentración de cada sistema se realizó filtrando las muestras con ayuda de una jeringa desechable provista de un dispositivo de filtración con membranas millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro tipo HVLP. Para la determinación espectrofotométrica se tomaron alícuotas que se diluyeron a un volumen adecuado que permitiera su análisis. Los estudios preliminares demostraron que en la mayoría de los casos, fue suficiente un periodo de 48 horas para asegurar la saturación del sistema.

La densidad de las muestras filtradas para cada temperatura, se determinó con matraces volumétricos de 5 mL previamente tarados. Cada ensayo de densidad se determinó por triplicado.

#### **8.6.1 Determinación de las magnitudes termodinámicas del proceso de solubilización.**

Con los datos de concentración en función de la temperatura en grados Celsius, se determinó el perfil de saturación para cada sistema disolvente y el modelo matemático que describe dicha relación. Asimismo se elaboraron curvas de vant' Hoff aplicando la expresión matemática correspondiente.

# ***RESULTADOS***

## 9. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE TESTOSTERONA MATERIA PRIMA

### 9.1 IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE CALIDAD DE TESTOSTERONA ANHIDRA

La tabla I presenta los resultados de las pruebas de control de calidad realizadas a la materia prima de testosterona utilizada como material para la obtención de los distintos cristales motivo de este estudio, así como la realización de los ensayos de solubilidad. Los datos mostraron su correspondencia con testosterona anhidra con calidad farmacopéica.

**Tabla I. Resultados de los ensayos de identificación y valoración de testosterona materia prima.**

Determinación	Especificación†	Resultado
Descripción	Cristales o polvo cristalino, blanco o ligeramente blanco-amarillento. Inodoro y estable al contacto con el aire.	Polvo cristalino, blanco. Inodoro y estable al contacto con el aire.
Identificación		
• Absorción al infrarrojo	La muestra debe presentar los mismos máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que el estándar de referencia de testosterona.	La muestra presentó los mismos máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que el estándar de referencia de testosterona anhidra.
• Absorción al UV	La muestra debe presentar los mismos máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que el estándar de referencia de testosterona.	La muestra presentó los mismos máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda que el estándar de referencia de testosterona anhidra.
Pérdida por secado	No más de 1.0%	0.1%
Impurezas Orgánicas Volátiles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cloroformo 60 µg/g</li> <li>• 1,4-Dioxano 380 µg/g</li> <li>• Cloruro de metileno 600 µg/g</li> <li>• Tricloroetileno 80 µg/g</li> </ul>	No presentó impurezas. Método V, USP.
Valoración	Entre el 93.0% y 103.0% del contenido de Testosterona.	100.6 %

† Cfr. USP 29.

## 9.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA, PARA CUANTIFICAR TESTOSTERONA EN LOS ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD.

Para poder disponer de una técnica analítica de cuantificación de testosterona sencilla, exacta y reproducible, que fuera aplicable a los distintos ensayos de solubilidad y velocidad de disolución, se validó un método analítico por espectrofotometría UV, a partir del conocimiento de la solubilidad de testosterona en metanol.

### **Especificidad a la membrana de extracción**

En la figura 5 se presenta un espectro típico de la solución de referencia (SR) de testosterona anhidra y en la figura 6 se muestra el espectro obtenido con la materia prima en el ensayo de especificidad a la membrana de extracción.

Los resultados de especificidad fueron semejantes al utilizar membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  tamaño de poro tipo HVLP y las membranas Whatman de 0.7  $\mu\text{m}$  GF/F w/GMF, al filtrar agua, mezclas acetona:agua y mezclas de metanol:agua en las proporciones de 50:50 hasta 90:10 para cada sistema, por lo que se presenta el espectro que presentó sólo una de estas mezclas con una membrana.

La comparación de ambas figuras permite apreciar que al utilizar cualquiera de las membranas y sistemas disolventes, no existe alguna señal que interfiera con la longitud de onda en la cual aparece el espectro de la testosterona, por lo que con el uso de ambas membranas y el procedimiento propuesto, el método resulta ser específico para la cuantificación de testosterona.

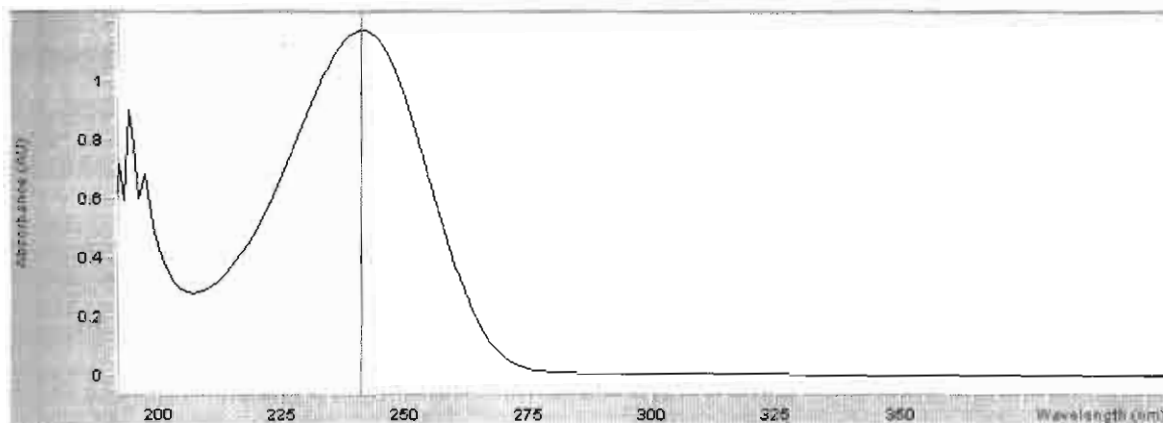


Figura 5. Espectro ultravioleta típico de testosterona.

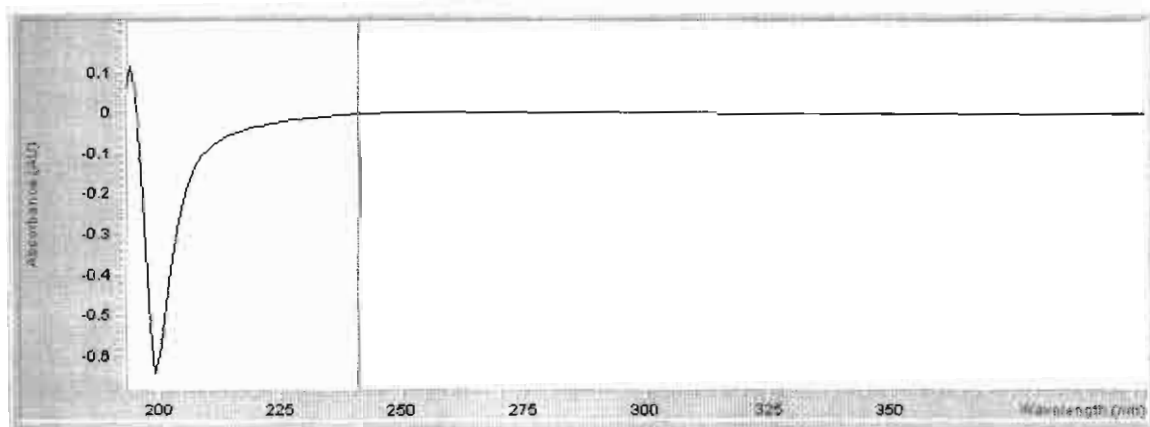


Figura 6. Espectro ultravioleta de agua purificada filtrada utilizando membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  tamaño de poro, tipo HVLP. Especificidad a la membrana de extracción al filtrar agua purificada.

### Linealidad del sistema analítico

En la tabla II se muestra los datos obtenidos para el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, utilizando como variable independiente "x" a las concentraciones de testosterona y como variable dependiente "y" las absorbancias. La ecuación de la recta fue  $y = 0.0564x + 0.0137$ , con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98 y la ordenada al origen no ha sido significativamente diferente de cero.

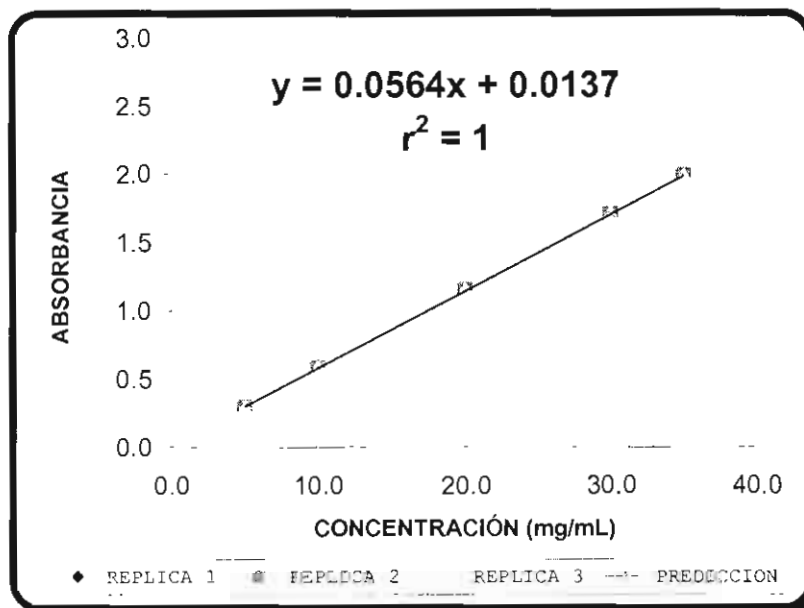
Adicionalmente, se observó que el intervalo de confianza al 95% para la pendiente no incluyó al cero.

	Ordenada	Pendiente
IC 95% superior =	0.0186	0.0566
IC 95% inferior =	0.0087	0.0561

El coeficiente de variación del factor respuesta fue menor a 3.0%

Debido a lo anterior, el sistema resultó ser lineal en el intervalo de 25.0% a 175.0% para testosterona, como se indica en el método analítico.

En la figura 7 se presenta el gráfico obtenido con los resultados del ensayo de linealidad, comprobándose que existe una relación lineal entre la concentración de testosterona en el intervalo de estudio y los correspondientes valores de absorbancia.



**Figura 7. Gráfico de linealidad del sistema para testosterona en metanol.**

**Tabla II. Respuesta en cada nivel y precisión del factor respuesta para el ensayo de linealidad del sistema analítico para testosterona.**

Nivel %	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia	Factor respuesta
25.0	5.0	0.29186	0.0584
	5.0	0.29243	0.0585
	5.0	0.29145	0.0583
50.0	10.0	0.57706	0.0577
	10.0	0.57975	0.0580
	10.0	0.57694	0.0577
100.0	20.0	1.14320	0.0572
	20.0	1.14930	0.0575
	20.0	1.14990	0.0575
150.0	30.0	1.70030	0.0567
	30.0	1.70280	0.0568
	30.0	1.70230	0.0567
175.0	35.0	1.98190	0.0566
	35.0	1.98720	0.0568
	35.0	1.98500	0.0567
n =			15
Promedio =			0.06
D. E. =			6.72E-04
C.V. =			1.2

### Precisión del sistema

En la tabla III se muestra los datos con los que se realizó el análisis para la precisión del sistema y se aprecia que las seis inyecciones sucesivas tienen un coeficiente de variación menor al 2.0% para testosterona, por lo que el sistema resultó ser preciso.

Tabla III. Resultados de precisión del sistema analítico para testosterona.

Réplica	Concentración μg/mL	Absorbancia
1	20.0	1.15150
2	20.0	1.15520
3	20.0	1.15480
4	20.0	1.15460
5	20.0	1.15350
6	20.0	1.15300
	n =	6
	Promedio =	1.15377
	D.E. =	1.39E-03
	C.V. =	0.1

### Linealidad del método

En la tabla IV se presenta los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, utilizando como variable independiente "x" a los μg/mL de testosterona adicionados a la muestra analítica y como variable dependiente "y" a los μg/mL recuperados con el procedimiento analítico. La ecuación de la recta fue  $y = 1.0014x - 0.0941$ , con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 1.0.

La ordenada al origen no ha sido significativamente diferente de cero, el intervalo de confianza al 95% para la ordenada no incluye al cero sin embargo, la guía de Validación indica utilizar otro criterio estadístico que sea justificable por lo cual, se consideró el criterio de que la ordenada al origen relativa debería encontrarse entre -0.03 y 0.03, que es el error permitido para el método (3.0% por tratarse de un método espectrofotométrico). La pendiente relativa tuvo un valor de -0.0047, cumpliendo el criterio de aceptación.

El intervalo de confianza al 95% de la pendiente incluyó al uno.

	Ordenada	Pendiente
IC <sub>95%</sub> Superior =	-0.0553	1.0030
IC <sub>95%</sub> Inferior =	-0.1329	0.9997



También se observó que el promedio del porcentaje recuperado por nivel y global, así como el intervalo de confianza se encontraron entre 97.0 y 103.0% y el coeficiente de variación del porcentaje recuperado por nivel no fue mayor al 3.0 %.

La figura 8 muestra la gráfica de linealidad del método, en donde se observa que existe una relación lineal entre los  $\mu\text{g/mL}$  adicionados de testosterona y los  $\mu\text{g/mL}$  recuperados del mismo compuesto. De acuerdo a estos los datos, el método es lineal en el intervalo de concentración de 5.0 a 35.0  $\mu\text{g/mL}$  de testosterona, correspondientes al 25.0% y 175.0% en la muestra analítica.

El intervalo de confianza al 95%, con un número de grados de libertad de  $gl = 11$  para el porcentaje recuperado es el siguiente:

Límite Superior = 99.8 %  
 Límite Inferior = 98.7 %

**Tabla IV. Resultados de linealidad del método para cuantificar testosterona.**

	25	100	175
<b>Réplica</b>	<b>Por ciento recuperado</b>		
1	98.352	99.490	99.766
2	98.442	99.735	99.923
3	98.326	99.600	99.969
n =	3	3	3
Promedio =	98.4	99.6	99.9
D. E. =	6.09E-02	1.23E-01	1.06E-01
C.V. =	0.1	0.1	0.1
n =	9		
Promedio =	99.3		
D. E. =	7.03E-01		
C.V. =	0.7		

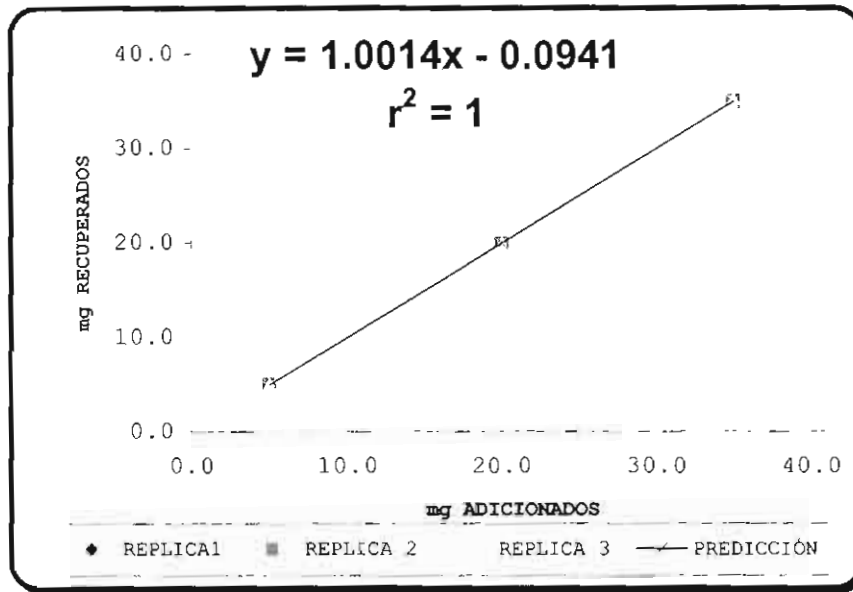


Figura 8. Gráfico de linealidad del método para testosterona.

### Exactitud del método

En la tabla V se muestra los valores de porcentaje recuperado de las muestras evaluadas para la prueba de exactitud del método.

El intervalo de confianza al 95%, ( $gl = 5$ ), para el porcentaje recuperado al 100% de testosterona en el límite superior, fue de 100.1% y el límite inferior igual a 99.9%. Se observa que el porcentaje recuperado de las 6 muestras y su intervalo de confianza al 95% para ambos compuestos de interés se encuentra entre el 97.0 y 103.0%. De acuerdo a lo anterior, el método propuesto es exacto con un error no mayor al 3.0%.

**Tabla V. Valores obtenidos en el ensayo de exactitud y precisión del método, utilizando el nivel de 100% de porcentaje de recuperación.**

Réplica	$\mu\text{g/mL}$ Adicionados	$\mu\text{g/mL}$ Recuperados	Por ciento Recuperado
1	20.000	19.963	99.815
2	20.000	19.997	99.985
3	20.000	20.003	100.015
4	20.000	20.006	100.030
5	20.000	20.007	100.035
6	20.000	19.985	99.925
n =			6
Promedio =			100.0
D.E. =			8.50E-02
C.V. =			0.1

### Precisión del método

#### a) Repetibilidad

Como se observa en la tabla V, el coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación de testosterona de las seis réplicas analizadas en el ensayo de exactitud del método, fue menor al 3.0%, lo cual indica que el método tiene una repetibilidad adecuada.

#### b) Intervalo

El método resultó ser lineal, exacto y preciso en el intervalo del 25% a 175% para testosterona.

### Robustez

#### Estabilidad analítica de la muestra

La diferencia absoluta de los promedios de los porcentajes cuantificados a las 24 y 48 horas de almacenamiento de las muestras a temperatura ambiente en condiciones normales de luz y oscuridad, respecto al tiempo cero, no fue mayor al 3.0%. Por lo que se puede asegurar que las muestras son estables al menos 48 horas después de haber sido preparadas y almacenadas bajo esas condiciones.

### 9.3 OBTENCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN LOS POLIMORFOS DE TESTOSTERONA MONOHIDRATADA.

#### ❖ CONTENIDO DE AGUA

Los resultados de contenido de agua de los cristales de testosterona anhidra y los monohidratos I y II se reportan en la tabla VI, se observó que la testosterona anhidra tiene menor contenido de agua, que los polimorfos I y II. Estos resultados confirman los reportados por Kang (1974), ya que el contenido de agua para los monohidratos de testosterona oscilan entre 5.9 a 6.0%.

**Tabla VI. Contenido de agua para la testosterona anhidra y sus polimorfos monohidratos**

IDENTIFICACIÓN	CONTENIDO DE AGUA (%)
Testosterona	0.12%
Testosterona Monohidrato I	5.35%
Testosterona Monohidrato II	5.71%

#### ❖ MICROSCOPIA ÓPTICA (HÁBITO CRISTALINO)

El análisis microscópico de las muestras cristalinas obtenidas en los distintos sistemas de disolventes demostró que el sistema de etanol:agua (90:10) contenía sólidos cristalinos de color blanco, conformado por partículas y agregados que presentan una morfología euhédrica con hábito planar monoclinico, como se muestra en la figura 9 y como se demotró posteriormente, corresponden al polimorfol. Por otra parte en los lotes obtenidos bajo el sistema de disolventes acetona:agua (90:10), se observaron sólidos cristalinos de color blanco con hábito acicular ortorrómbico, como se observa en la figura 10, los resultados correspondel al polimorfo II.

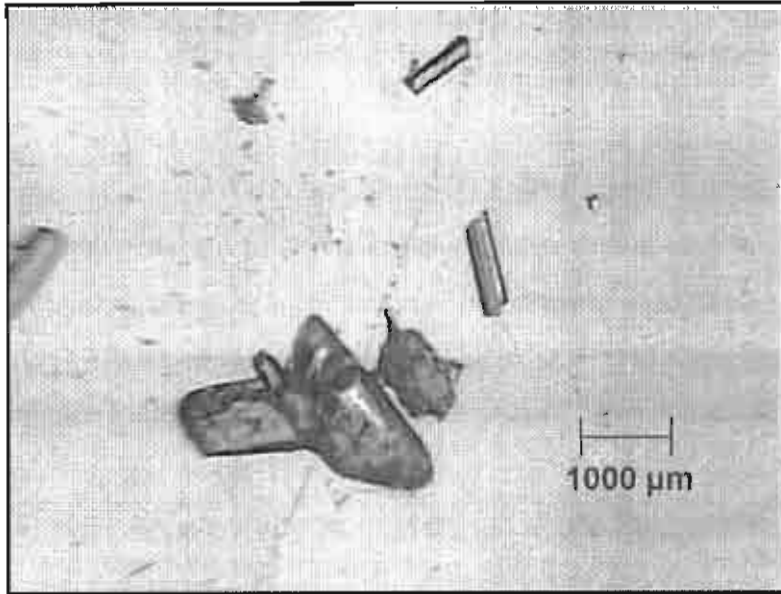


Figura 9. Imágenes de microscopía óptica del hábito de cristales de testosterona polimorfo I. Ampliación 40X.

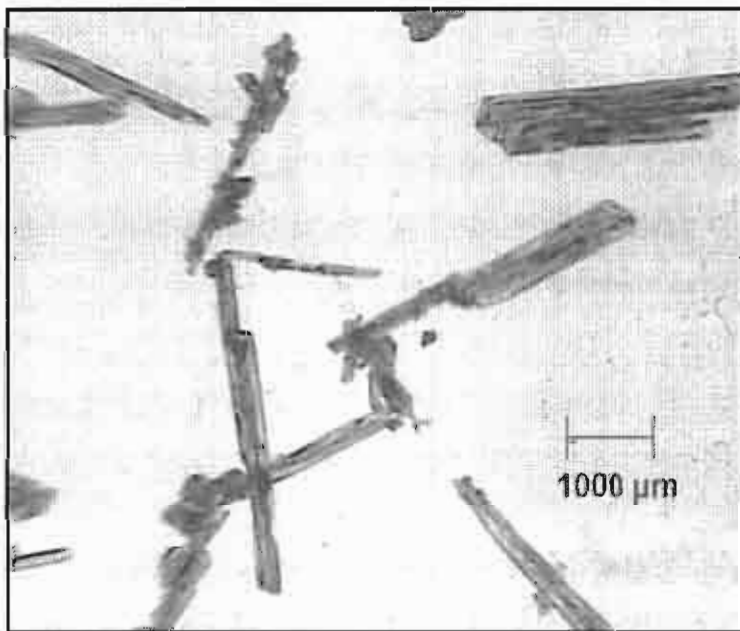


Figura 10. Imágenes de microscopía óptica del hábito de cristales de testosterona polimorfo II. Ampliación 40X.

## ❖ ESPECTROSCOPIA AL INFRARROJO

En la figura 11 se observan los espectros de infrarrojo (IR) de la testosterona anhidra y de los polimorfos I y II, obtenidos respectivamente, con los sistemas disolventes etanol:agua (90:10) y acetona:agua (90:10).

En la tabla VII se indican las principales bandas de absorción al infrarrojo obtenidas con las muestras de testosterona anhidra, testosterona monohidrato I y II, que permitieron su respectiva identificación.

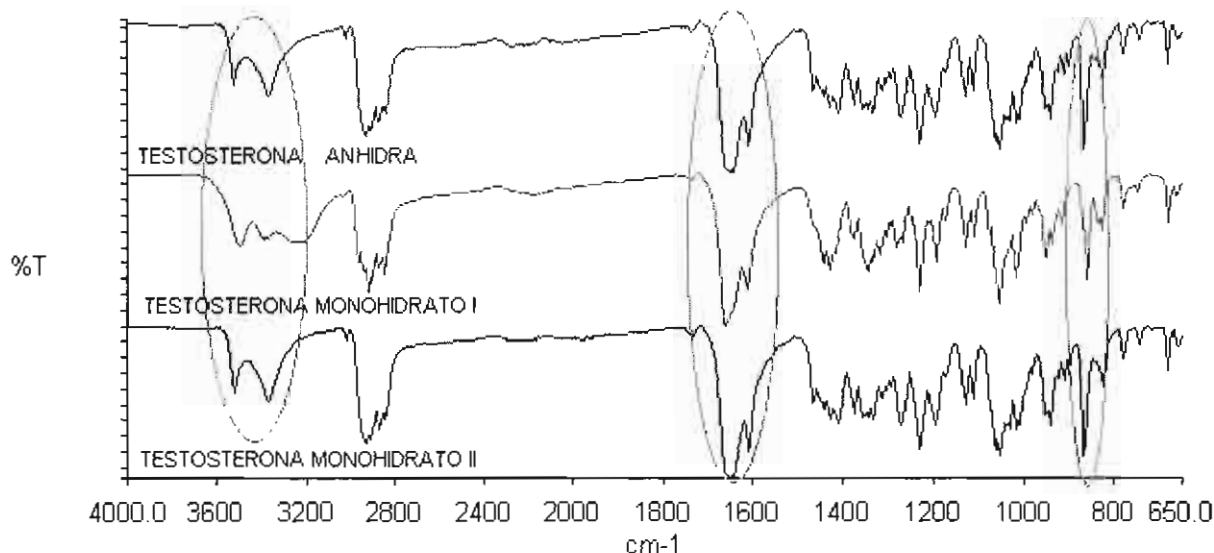
**Tabla VII. Principales bandas al infrarrojo de testosterona anhidra y de los polimorfos monohidratados I y II.**

Identificación	$\nu_{OH}$	$\nu_{OH}$	$\nu_{CO}$	$\nu_{C=C}$	$\delta_{C-CH_3}$	$\delta_{C-CH_3}$	$\delta_{OH}$	$\nu_{C-O}$	$\nu_{C=CH}$
Testosterona Anhidra	3510	3370	1669 1660	1615	1450	1367	1238	1070 1060	873
Testosterona Monohidrato I	3515	3395 3195	1668 1648	1622	1452	1352	1238	1061	867
Testosterona Monohidrato II	3520	3360 3195	1659 1647	1612	1450	1350	1238	1066	869

Con dichos datos se construyó la tabla VII, para posteriormente observar y precisar el efecto de las mezclas disolventes. Las principales bandas del espectro infrarrojo que permitieron identificar la testosterona y la formación de los cristales monohidratos así como inferir las diferencias entre el polimorfo I y II fueron las siguientes: la banda que aparece a  $873\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{C=CH}$ ) para testosterona anhidra, señala para el caso de los polimorfos, una deslocalización de electrones en el anillo aromático A que se compensa con un enlace de hidrógeno (ver fórmula estructural en los antecedentes). Este hecho describe la formación de puentes de hidrógeno intermolecular; siendo ésta la razón por la que la banda se desplaza en los monohidratos I y II.

Por otra parte la banda que aparece alrededor de  $1660\text{ cm}^{-1}$  pertenece a la cetona alfa beta insaturada de la posición del carbono 3 ( $\nu_{CO}$ ), este grupo funcional esta directamente relacionado con la formación de los enlaces de hidrógeno. En los monohidratos la banda que se observa en el espectro tiene un ligero desplazamiento.

La presencia de la banda a  $3500\text{ cm}^{-1}$  corrobora la existencia de agua en la molécula, esta banda esta relacionada con el grupo hidroxilo ( $\nu\text{OH}$ ) de los puentes de hidrógeno presentes.



**Figura 11. Espectros de absorción al infrarrojo de testosterona anhidra y los monohidratos I y II.**

#### ❖ CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La tabla VIII muestra los valores de los parámetros fisicoquímicos promedio, obtenidos por calorimetría diferencial de barrido de la testosterona anhidra y los monohidratos I y II. Asimismo en la figura 12 se presentan las curvas de comportamiento térmico correspondientes para cada compuesto.

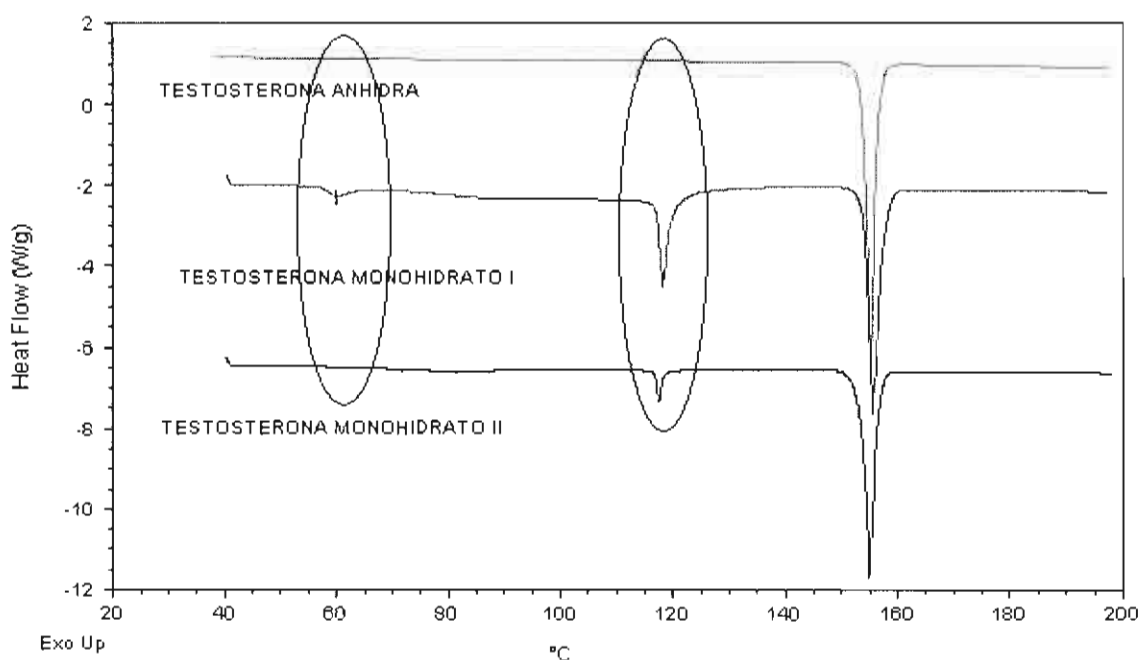
Durante el análisis se observó que las condiciones del ensayo, como el peso de muestra, la velocidad de flujo de nitrógeno y la velocidad de calentamiento, entre otras, fueron las adecuadas para la determinación de los eventos térmicos esperados. Cabe mencionar que el equipo utilizado presenta los eventos endotérmicos con dirección hacia abajo de la línea base y los eventos exotérmicos con dirección hacia arriba de la línea base.

**Tabla VIII. Parámetros térmicos promedio\* de testosterona anhidra y de los polimorfos monohidratados I y II, obtenidos por análisis de calorimetría diferencial de barrido.**

Identificación	T <sub>i</sub> °C	ΔH <sub>t</sub> J/g	T <sub>d</sub> °C	ΔH <sub>d</sub> J/g	T <sub>f</sub> °C	ΔH <sub>f</sub> J/g
Testosterona	----	----	----	----	152.47	92.56
Testosterona Monohidrato I	53.45	7.778	117.03	23.86	153.48	91.40
Testosterona Monohidrato II	----	----	117.01	29.88	153.75	90.90

\* Promedio de tres determinaciones. T<sub>i</sub> °C = Temperatura de transición; ΔH<sub>t</sub> = Calor de transición; T<sub>d</sub> °C = Temperatura de deshidratación; ΔH<sub>d</sub> = Calor de deshidratación; T<sub>f</sub> °C = Temperatura de fusión; ΔH<sub>f</sub> = Calor de fusión.

De tal forma, se observa que el cambio de entalpía o de contenido calorífico para el paso del estado sólido al líquido mediante el incremento de la temperatura, fue mayor para la muestra anhidra y menor para la testosterona monohidrato II, lo cual concuerda con los respectivos resultados de solubilidad (Tabla XVII, resultados de X<sub>B</sub><sup>I</sup>).



**Figura 12. Curvas de comportamiento térmico de los polimorfos monohidratados I y II, así como de la testosterona anhidra, obtenidas por calorimetría diferencial de barrido.**



El perfil térmico de la testosterona anhidra, sólo muestra el evento térmico de la fusión de la fusión ( $T^F$ ) a la temperatura de 152°C. La testosterona monohidrato I tiene 3 eventos térmicos, el primero es una transición ( $T_t$ ) a 53°C aproximadamente, el cual corresponde a un reacomodo molecular. La segunda endoterma ( $T_d$ ) es una deshidratación a 117°C y la tercera, corresponde a la temperatura de fusión a 153°C, tal y como se describe en la tabla XIV.

Respecto al polimorfo II, sólo se observa la deshidratación y fusión a las temperaturas antes mencionadas. Las transiciones a 53°C y 117°C demostraron ser irreversibles durante los experimentos de calorimetría diferencial de barrido. Estos resultados corresponden con lo publicado por Frøkjøer y Andersen en 1974 para ambos monohidratos.

## ❖ DIFRACCIÓN DE RAYOS X

### a) Monocristales

La tabla IX muestra los valores de los parámetros de la celda unitaria en los cristales obtenidos bajo diferentes sistemas de disolventes. El sistema cristalino de interés es el monoclinico ya que corresponde al monohidrato I, mientras que el sistema ortorrómbico corresponde al Monohidrato II. El sistema ortorrómbico mostró todos los ángulos igual a 90°, el sistema monoclinico tiene el ángulo  $\beta$  diferente de 90°,  $\alpha$  y  $\gamma$  igual a 90.

Las condiciones teóricas se cumplen en los resultados obtenidos. Los valores encontrados para la celda unitaria, obtenidos con el sistema de disolventes etanol:agua (90:10) corresponden a un sistema monoclinico similar a los obtenidos por Roberts en 1978, con una mezcla etanol:acetato de etilo.

Tabla IX. Valores de la celda unitaria obtenidos por difracción de rayos X para monocristales.

Sistema disolvente				Ángulos			Sistema cristalino
	a	b	c	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	
Etanol:acetato de etilo	14.720	11.080	10.868	90.0	113.34	90.0	Monoclínico Testosterona anhidra
Etanol:agua (90:10)	9.5302	8.1363	11.0106	90.0	7.0651	90.0	Monoclínico Monohidrato I
Acetona:agua (90:10)	7.9341	13.6251	15.9363	90.0	90.0	90.0	Ortorrómico Monohidrato II

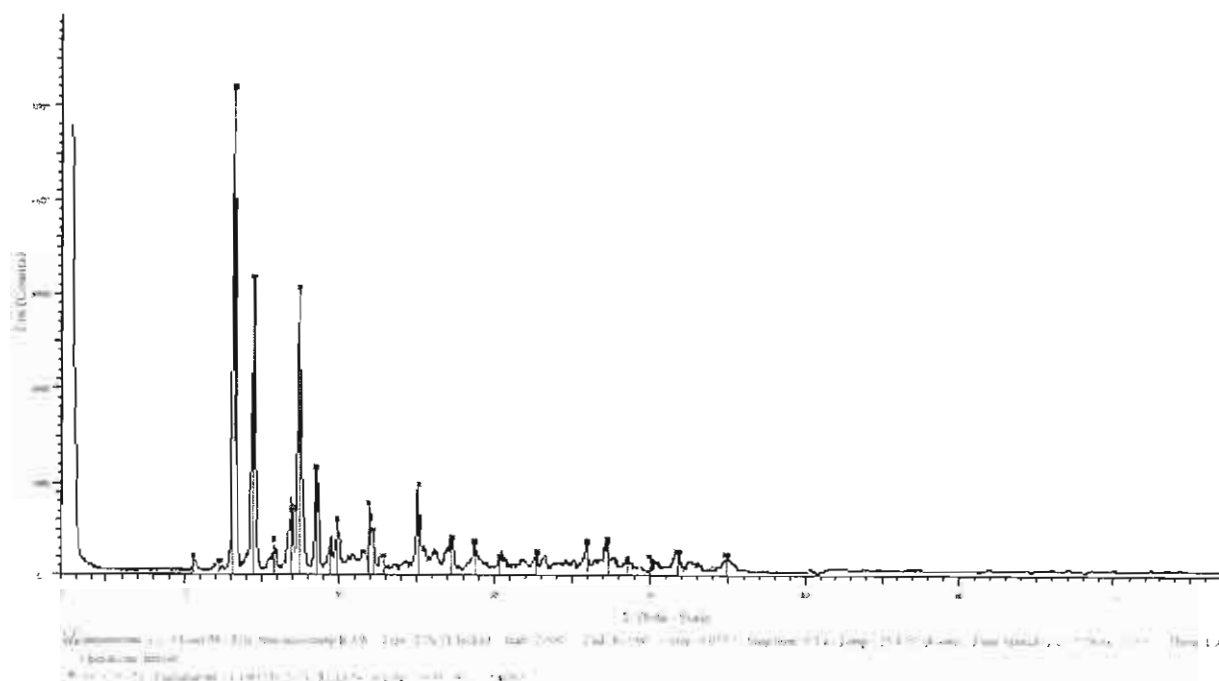
### b) Polvo

Los patrones de difracción de rayos X para polvos, típicos de testosterona anhidra y los correspondientes monohidratos, se ilustran en la figura 13. Así mismo, la tabla X muestra los principales ángulos de difracción de rayos X.

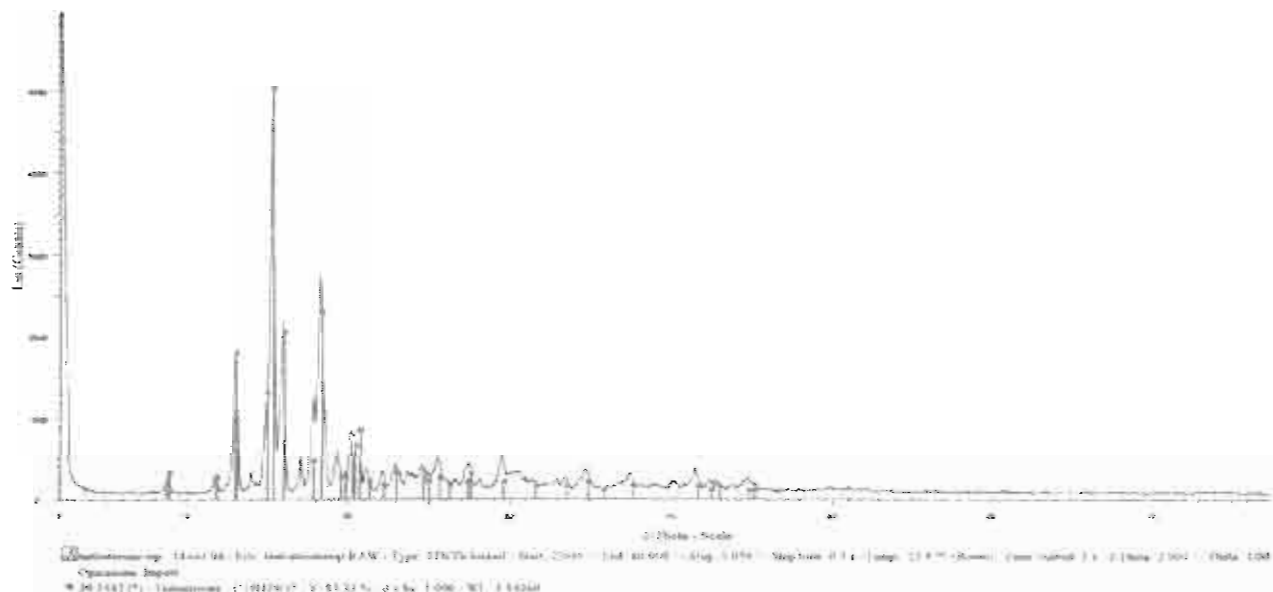
La testosterona anhidra mostró difracciones intensas características de ángulos  $2\theta$  a  $12^\circ$ ,  $15^\circ$  y  $19^\circ$ . Los monohidratos presentaron picos de difracción del estado sólido, lo que indicó la existencia de un estado cristalino. El monohidrato I presentó un patrón de difracción de ángulo  $2\theta$  a  $14^\circ$ ,  $16^\circ$  y  $19^\circ$ . En el caso del monohidrato II, los valores de  $2\theta$  fueron  $17^\circ$ ,  $19^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $23^\circ$  y  $39^\circ$ .

Tabla X. Resultados obtenidos por difracción de rayos X para polvos.

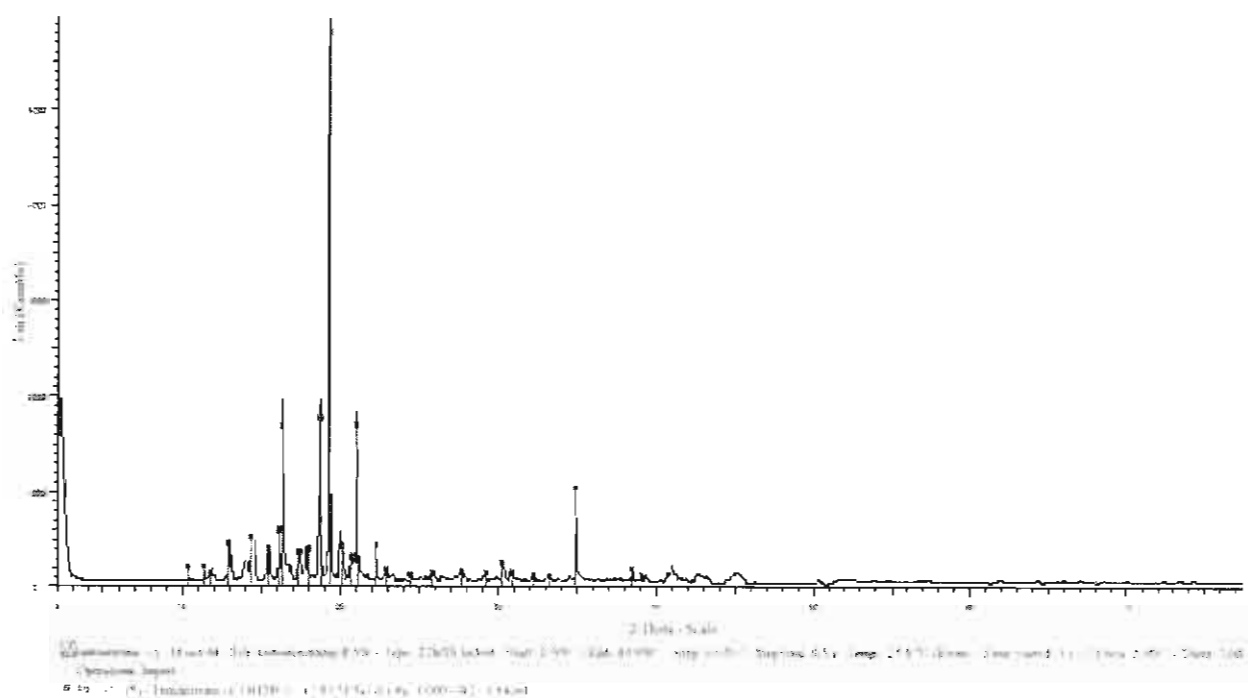
Valores del ángulo de $2\theta$	Compuesto		
	Testosterona anhidra	Testosterona monohidrato I	Testosterona monohidrato II
8.90		13.25	14.05
13.05		14.75	15.08
15.25		17.15	17.90
15.90		20.45	20.55
17.00		24.55	21.20
18.25		28.15	21.95
			23.15
			38.75



A) Testosterona monohidrato I



**B) Testosterona anhidra**



**C) Testosterona monohidrato II**

**Figura 13. Comparación de difractogramas de rayos X para testosterona anhidra y los monohidratos I y II.**

❖ **DISOLUCIÓN INTRÍNSECA**

Los resultados obtenidos de cada uno de los lotes de prueba se muestran en las figuras 14 a 17, donde se relaciona la masa liberada por unidad de superficie en función del tiempo. Dado que la tableta no se desintegró, el área de contacto con el medio de disolución permaneció constante durante el estudio. Los datos se ajustaron a una cinética de orden cero y los parámetros se reportan en la tabla XI.

Los valores de velocidad de disolución para las tres muestras cristalinas estudiadas fueron menores a  $0.1 \text{ mg/min/cm}^2$ , valor límite asociado con fármacos clasificados como de baja solubilidad. Estos resultados permiten confirmar que el monohidrato I de la testosterona obtenido con el sistema etanol:agua (90:10) es la forma cristalina menos soluble en ácido clorhídrico 0.1 M, por lo que se considera que ésta sería la forma polimórfica más adecuada para proponer una formulación inyectable en suspensión de liberación retardada, partiendo también de la base que el sistema de cristalización para obtener dicho monohidrato es factible de realizarse a nivel industrial.

**Tabla XI. Resultados estadísticos de la prueba de velocidad de disolución intrínseca.**

<b>Compuesto</b>	<b>Constante de velocidad intrínseca</b>	<b>Intercepto</b>
Testosterona Anhidra	0.0156	-0.0297
Testosterona Monohidrato I	0.0052	0.2008
Testosterona Monohidrato II	0.0091	0.1496

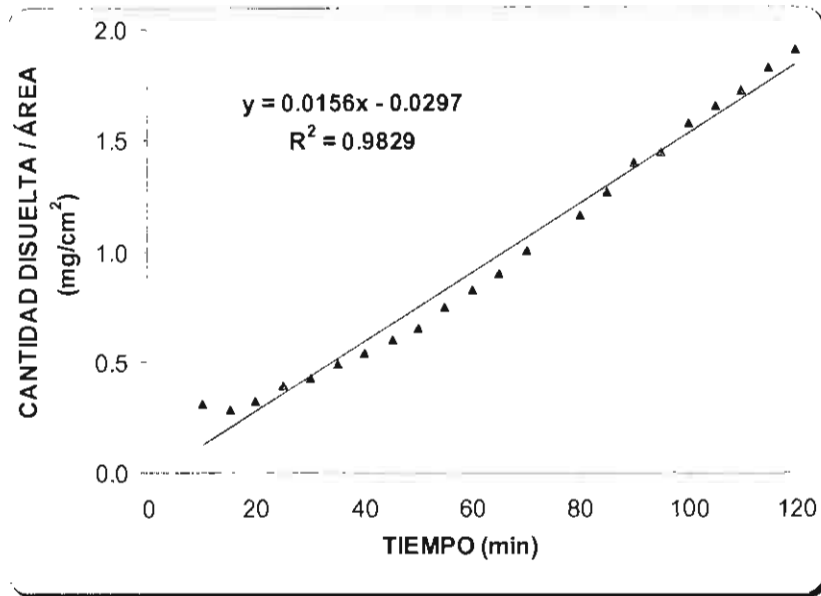


Figura 14. Gráfico de velocidad de disolución intrínseca de testosterona anhidra.

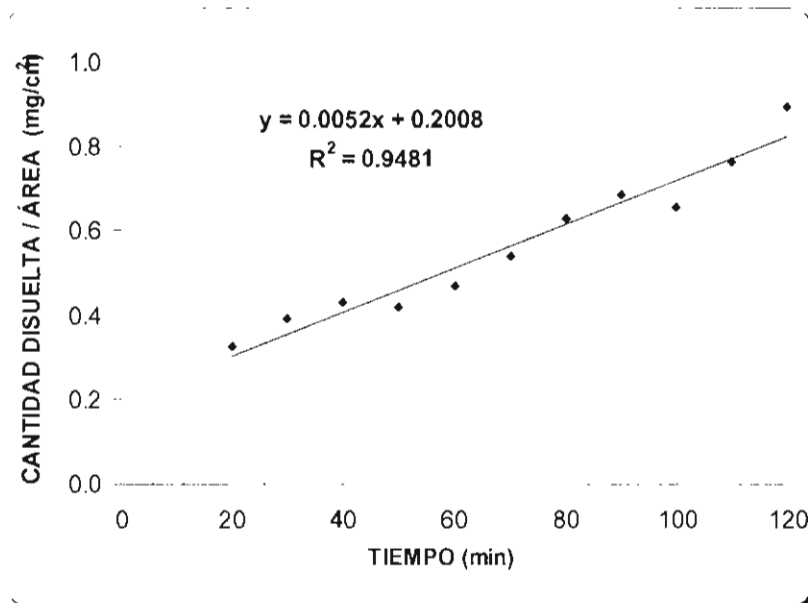


Figura 15. Gráfico de velocidad de disolución intrínseca de testosterona monohidrato I.

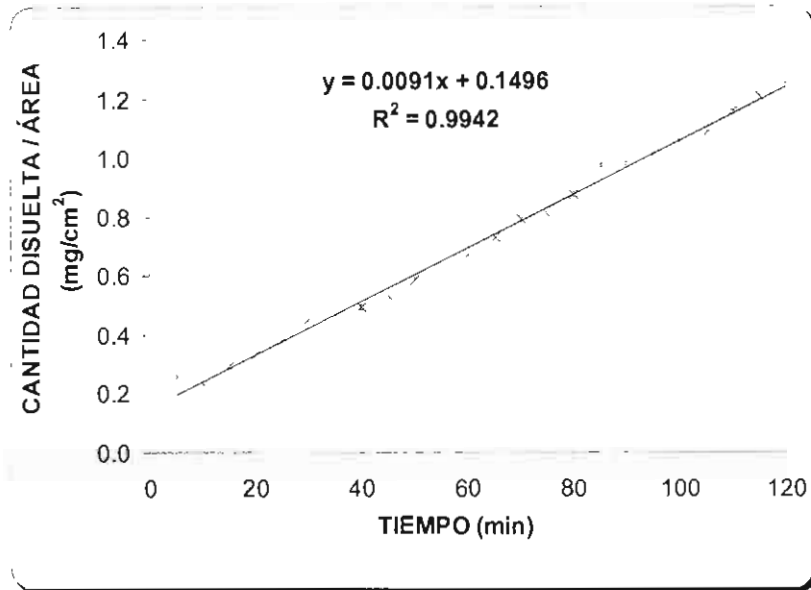


Figura 16. Gráfico de velocidad de disolución intrínseca de testosterona monohidrato II.

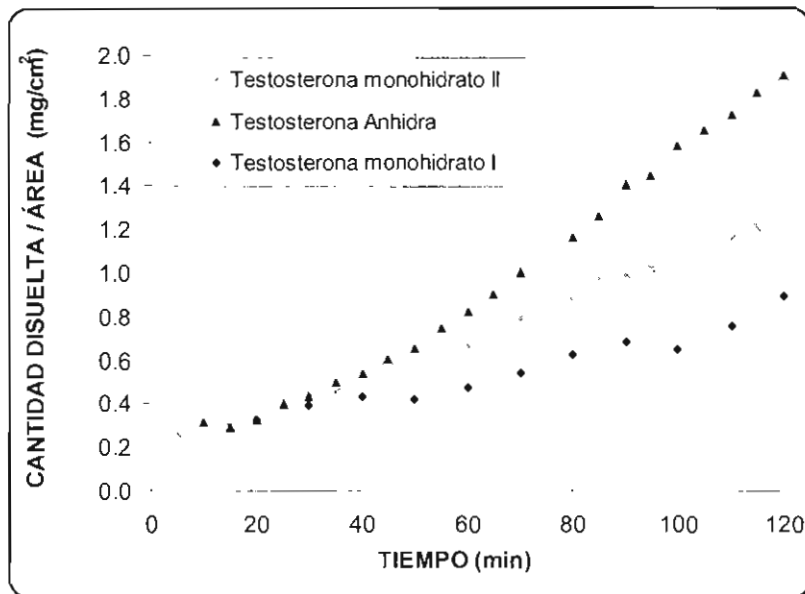


Figura 17. Gráfico comparativo de la velocidad de disolución intrínseca de las tres fases cristalinas de testosterona en estudio.

#### 9.4 CURVAS DE SATURACIÓN DE TESTOSTERONA Y DETERMINACIÓN DE LAS MAGNITUDES TERMODINÁMICAS DE SOLUBILIZACIÓN EN AGUA Y EN LAS MEZCLAS DE DISOLVENTES.

En las tablas A.1 a la A.11 del Anexo, se muestran los datos obtenidos en los ensayos de saturación de los distintos sistemas disolventes en estudio, con la testosterona anhidra, así como de los monohidratos I y II; en ellas se relaciona las concentraciones obtenidas en g/mL por cada valor de temperatura.

Con dichos datos se construyeron las distintas curvas de solubilización, utilizando como variable "X" el valor de temperatura en °C y como variable "y" la concentración en g/mL, para posteriormente observar y precisar el efecto de las mezclas disolventes y de la temperatura, sobre la cantidad de masa de principio activo disuelto y así poder predecir las mejores condiciones termodinámicas que pudieran permitir un mejor manejo de la cristalización de cada sistema cristalino, en condiciones factibles de escalar a un nivel industrial, con el menor gasto de energía, costo de insumos e impacto ambiental de la mezcla disolvente. Las ecuaciones correspondientes fueron producto del análisis estadístico utilizando el software Statgraphics® Plus 4.0 y se muestran respectivamente, en las tablas XII a XIV.

**Tabla XII. Ecuaciones que describen la solubilización de la testosterona anhidra en agua y mezclas disolventes.**

Sistema Disolvente	Ecuación
Agua	$y = -4E-05x^4 + 0.0055x^3 - 0.2716x^2 + 5.7033x - 34.786$
Etanol:Agua (90:10)	$y = 4.5245x^2 + 1809x + 6679.9$
Acetona:agua (65:35)	$y = -2.947x^2 + 371.25x + 11683$
Acetona:agua (80:20)	$y = -17.602x^2 + 1922.5x - 429.05$
Acetona:Agua (90:10)	$y = 25.73x^2 + 669.53x + 17682$



**Tabla XIII. Ecuaciones que describen la solubilización de la testosterona monohidrato I en agua y mezclas disolventes**

Sistema Disolvente	Ecuación
Agua	$y = -2E-05x^4 + 0.0023x^3 - 0.1175x^2 + 2.6138x - 18.303$
Etanol:Agua (90:10)	$y = 0.8115x^2 - 20.49x + 417.76$
Acetona:Agua (90:10)	$y = -0.3805x^2 + 40.86x - 210.99$

**Tabla XIV. Ecuaciones que describen la solubilización de la testosterona monohidrato II en agua y mezclas disolventes**

Sistema Disolvente	Ecuación
Agua	$y = 2E-05x^4 - 0.0024x^3 + 0.1164x^2 - 2.1296x + 15.23$
Etanol:Agua (90:10)	$y = 0.666x^2 - 10.57x + 343.7$
Acetona:Agua (90:10)	$y = -0.455x^2 + 44.07x - 131.37$

Todas las ecuaciones de solubilidad obtenidas, son polinomiales, tanto para la materia prima anhidra, como para los polimorfos I y II de la testosterona. Con ellas será posible modelar las condiciones de trabajo que se ajusten mejor a los intereses de cada proyecto de investigación o industrial, para la obtención de los diferentes polimorfos de testosterona, en cualquiera de estos sistemas de disolventes.

Para el presente estudio se consideró que el sistema etanol:agua en la proporción (90:10) fue el sistema disolvente más adecuado a los efectos de un posible escalamiento industrial para la obtención del polimorfo I de testosterona, ya que el

sólido obtenido bajo este sistema cumple con las características fisicoquímicas del monohidrato.

En la tabla XV se presentan las ecuaciones de vant' Hoff obtenidas por medio de regresión lineal de los datos de solubilidad en los sistemas disolventes estudiados, expresados como logaritmo natural de la fracción molar de testosterona disuelta ( $\ln X_B$ ) en función del inverso de la temperatura absoluta ( $1/T$ ), según la ecuación 1.

**Tabla XV. Ecuaciones de vant' Hoff para la testosterona anhidra y los monohidratos I y II en diferentes mezclas de disolventes.**

Compuesto	Disolvente	Ecuación
Testosterona Anhidra	Agua	$\ln X_B = -2977.4x + 4.0422$ [1/T (°K)]
	Etanol:agua (90:10)	$\ln X_B = -204.47x + 0.62$ [1/T (°K)]
	Acetona:agua (90:10)	$\ln X_B = -199.03x + 0.6053$ [1/T (°K)]
Testosterona Monohidrato I	Agua	$\ln X_B = -3641.4x + 4.9068$ [1/T (°K)]
	Etanol:agua (90:10)	$\ln X_B = -3292.5x + 8.8723$ [1/T (°K)]
	Acetona:agua (90:10)	$\ln X_B = -2746.7x + 7.2259$ [1/T (°K)]
Testosterona Monohidrato II	Agua	$\ln X_B = -3048.1x + 3.3403$ [1/T (°K)]
	Etanol:agua (90:10)	$\ln X_B = -3177.3x + 8.6069$ [1/T (°K)]
	Acetona:agua (90:10)	$\ln X_B = -2591.7x + 6.8335$ [1/T (°K)]

De estos datos se puede apreciar que todas las pendientes son negativas, lo que indica que el proceso de disolución de la testosterona en todos los sistemas disolventes es endotérmico, por ello su solubilidad aumenta con la temperatura y, en el sentido inverso, un descenso de la temperatura provoca una disminución de su solubilidad. En las figuras 18 a la 20, se presentan las gráficas de vant' Hoff para cada uno de estos sistemas disolventes, respectivamente.

En dichas gráficas se puede observar la relación que existe entre la fracción molar disuelta de testosterona (y los respectivos polimorfos) y el incremento de temperatura, de modo que en los gráficos, las pendientes de cada línea, de derecha a izquierda, representan una relación directamente proporcional, donde existe un incremento de la solubilidad con el aumento de la temperatura.

A su vez, en los gráficos también se visualiza que la testosterona anhidra es más soluble cuando se utiliza etanol o acetona mezclada con agua que en agua sola y cabe destacar que es evidente que el polimorfo I es menos soluble que el polimorfo II de testosterona, en todos los sistemas disolventes probados.

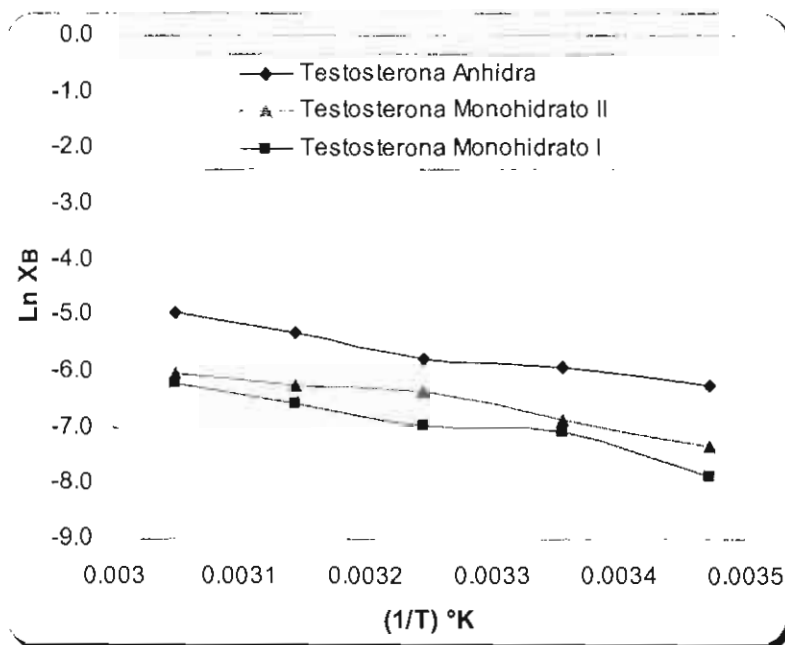


Figura 18. Gráfica de van't Hoff de la testosterona y sus polimorfos monohidratados en agua.

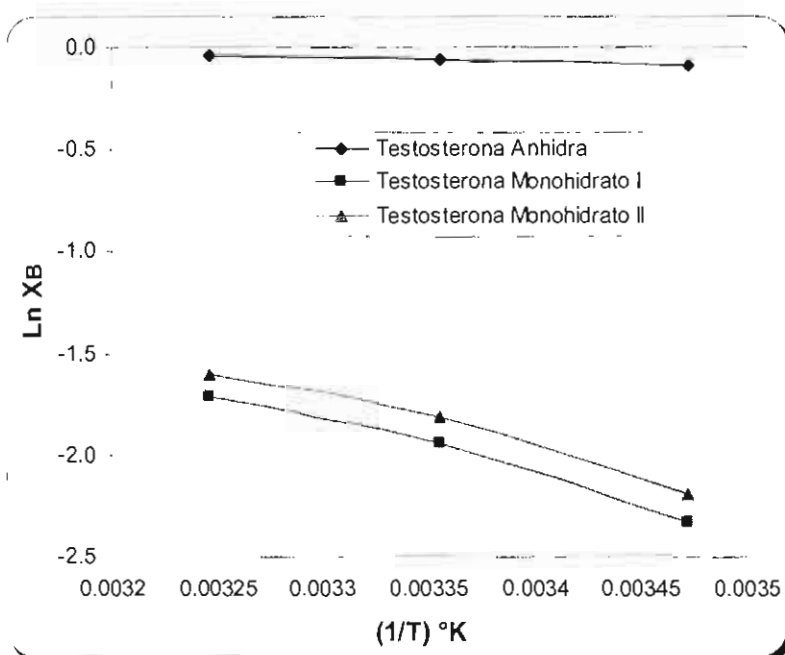


Figura 19. Gráfica de van't Hoff de la testosterona y sus polimorfos monohidratados en sistema de disolventes acetona:agua (90:10).

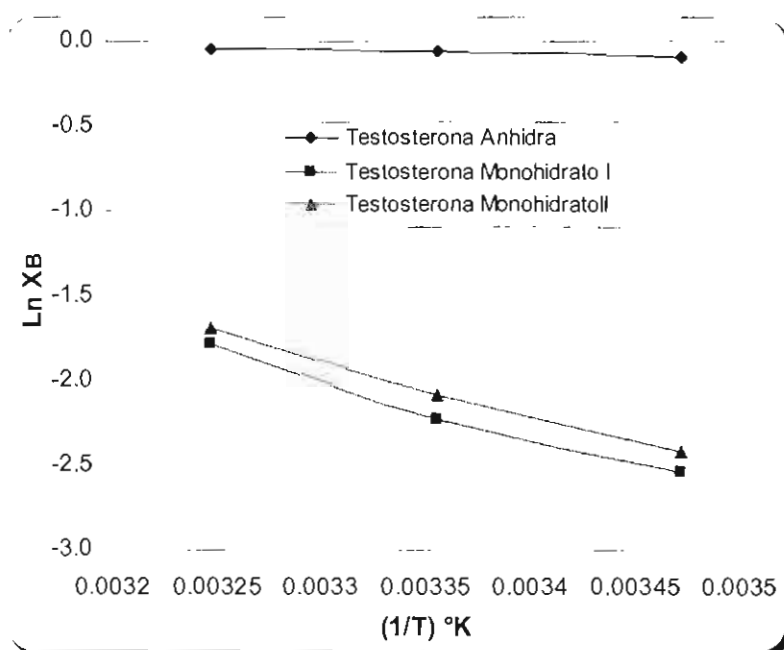


Figura 20. Gráfica de van't Hoff de la testosterona y sus polimorfos monohidratados en sistema de disolventes etanol:agua (90:10).

Tal y como describe la ecuación de vant' Hoff, se permite calcular la entalpía de disolución ( $\Delta H^S$ ) de la testosterona en dichos sistemas disolventes, de modo que aplicando la ecuación 2 descrita en los antecedentes de este trabajp, se obtuvieron los valores de entalpía de disolución que se muestran en la tabla XVI.

**Tabla XVI. Entalpías de disolución para la testosterona anhidra y los monohidratos I y II en diferentes mezclas de disolventes.**

Compuesto	Sistema disolvente	$\Delta H^S$ (kJ/mol)
Testosterona Anhidra	Agua	-24.75
	Etanol:agua (90:10)	-1.70
	Acetona:agua (90:10)	-1.65
Testosterona Monohidrato I	Agua	-30.28
	Etanol:agua (90:10)	-27.37
	Acetona:agua (90:10)	-22.84
Testosterona Monohidrato II	Agua	-26.42
	Etanol:agua (90:10)	-25.34
	Acetona:agua (90:10)	-21.55

Por otra parte, el valor absoluto de  $\Delta H^S$  expresa la magnitud de la variación de la solubilidad con la temperatura en estos sistemas disolventes y el hecho de que el valor se incremente conforme aumenta la polaridad de la mezcla disolvente, indica que la variación de la solubilidad de la testosterona en dichos sistemas, será más dependiente de la temperatura conforme aumente la polaridad de la mezcla. Estos datos correponden a un comportamiento esperado, debido a la naturaleza lipofílica de los solutos en estudio, lo cual se acentúa con los monohidratos.

En las tabla XVII se incluye los valores de solubilidad expresada en fracción molar ( $X_B$ ), temperatura de fusión, calor molar de fusión y solubilidad ideal ( $X_B^i$ ) de testosterona y los monohidratos I y II en las diferentes mezclas de disolventes. Como se puede apreciar, se corrobora que para cada una de las fases cristalinas en estudio, su solubilidad expresada como fracción molar, se ve disminuida a medida que aumenta la polaridad del disolvente.

**Tabla XVII. Magnitudes termodinámicas de testosterona anhidra y los polimorfos monohidratados I y II en diferentes mezclas de disolventes.**

Compuesto	Disolvente	Solubilidad (Fracción molar)	$T_F$ ( $^{\circ}K$ )	$\Delta H^F$ (J/mol)	$X_B^{i*}$
Testosterona Anhidra	Agua	0.00270	428	27384	-3.36
	Etanol:agua (90:10)	0.93843	428		-3.63
	Acetona:agua (90:10)	0.94344	428		-3.22
Testosterona Monohidrato I	Agua	0.00085	428		-3.42
	Etanol:agua (90:10)	0.10754	428	25359	-3.11
	Acetona:agua (90:10)	0.09631	428		-3.24
Testosterona Monohidrato II	Agua	0.00104	428		-3.34
	Etanol:agua (90:10)	0.12440	428		-3.05
	Acetona:agua (90:10)	0.16309	428	26903	-3.30

\* $X_B^i$  = solubilidad ideal

Por otra parte si se contrasta la información anterior con los valores calculados de solubilidad ideal ( $X_B^i$ ), no hay plena coincidencia puesto que este parámetro fisicoquímico sólo es una estimación de la fuerza de cohesión de las moléculas del soluto para cada fase cristalina, y éste no considera ningún tipo de interacción con el disolvente (fuerzas de adhesión soluto - disolvente o las fuerzas de cohesión disolvente - disolvente).

# *CONCLUSIONES*

## 10. CONCLUSIONES

- ❖ El método analítico desarrollado cumplió con los criterios de la guía mexicana de validación, habiendo demostrado su utilidad para los estudios de solubilidad de fases cristalinas de testosterona así como en los ensayos de disolución intrínseca.
- ❖ Los resultados de recristalización con las distintas mezclas disolventes demostraron que en la obtención de los monohidratos de testosterona, la composición de la mezcla disolvente y la proporción de cada constituyente, son factores que determinan la formación de la fase cristalina y su hábito; lo cual fue confirmado mediante las distintas técnicas instrumentales utilizadas.
- ❖ El polimorfo obtenido en el sistema acetona:agua (90:10) es de fase ortorrómbica y corresponde al monohidrato II de testosterona y formado en el sistema etanol:agua (90:10) es el monohidrato I, de fase monoclinica.
- ❖ La solubilidad de la testosterona anhidra y de los monohidratos I y II obtenidos en esta investigación, tanto en agua como en las mezclas disolventes probadas, fue significativamente distinta, y las ecuaciones polinomiales correspondientes permitirán establecer condiciones de sobresaturación aplicables en futuras propuestas de escalamiento.
- ❖ El cálculo de las magnitudes termodinámicas de solubilización aplicando los resultados experimentales para cada fase cristalina de la testosterona, permitió comprobar que existen diferencias en sus respectivos estados de agregación molecular, de modo que el monohidrato I resultó ser el solvatomorfo menos soluble.



- ❖ La velocidad de disolución de la testosterona anhidra y de sus respectivos monohidratos I y II, fue significativamente distinta, por lo que es de esperarse que la formulación de éstos en suspensión, de lugar a sistemas farmacéuticos con un perfil de disolución diferente.

#### ❖ **PERSPECTIVAS DEL TRABAJO**

El interés industrial de los resultados de esta investigación es la factibilidad de realizar el escalamiento para obtener cada uno de los monohidratos de testosterona, en función de las siguientes consideraciones:

1. Los sistemas disolventes propuestos tienen un bajo impacto en el medio ambiente y son de baja toxicidad, comparados a otras mezclas propuestas en la literatura.
2. La obtención de los cristales se lleva a cabo por sobresaturación con descenso de temperatura, por lo que el consumo de energía y de tiempo es bajo, comparado a otras técnicas publicadas.
3. De manera adicional, sería posible la optimización de otras operaciones unitarias involucradas en la obtención de los cristales, como son la filtración y el secado.

# *BIBLIOGRAFÍA*

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdou H. M. (1989). Dissolution, Bioavailability and Bioequivalence. Mack Printing Company, Easton, Pensilvania, E.U.A., pp. 26 -28, 313.
2. Allan C.A., Mc Lachlan R. I. (2004). Age related in testosterone and the rol of replacement therapy in older men. *Clin. Endocrinol.*, **60**: 653-670.
3. Boistelle, R., Astier, J. P. (1988). Crystallization mechanisms in solution. *J. Cryst. Growth*, **90**: 14 – 30.
4. Brain J. (2001). Andropause. Testosterone replacement therapy for aging men. *Can. Fam. Physician.*, **47**: 91-7.
5. Brown F. C. (1970). Física de los sólidos. 1ª ed. Reverte, México pp. 26 -29.
6. Bugay D. E. (2001). Characterization of the solid-state: Spectroscopic techniques. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **48**: 43 - 63.
7. Bustamante P. (2001). Disoluciones, en: Vila Jato J. L. (editor). Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Capitulo II. Editorial Síntesis, Madrid. pp. 143 – 205.
8. Cárdenas, H. y Cortés A., (1996). Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México pp. 52-53.
9. CDER/FDA, (2000). Guidance for Industry: Waiver of in vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms on a Biopharmaceutics Classification System. FDA, Rockville, E.U.A.

10. Chan H. K., Grant D. J., (1989). Influence of compaction on the disk intrinsic dissolution rates. *Int. J. Pharm.*, 57: 117 – 124.
11. Chong H. G., Grant D. J., (2001). Estimating the stability of polymorphs end hydrates from heats of solution and solubility data. *J. Pharm. Sci.*, 90 (9): 1277 – 1287).
12. Clas S. D., Hancock, (2002). Calorimetry in pharmaceutical research and development. en: Yalkowsky, S.H. (ed). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 289 - 301.
13. Conflat P. and Guyot-Hermann, A. M. (1994). Contribution of X-ray powder diffraction versus temperature to the solid state study of pharmaceutical raw materials. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 40 (6): 388 - 392.
14. Comhaire F. H. (2000). Andropause: Hormone Replacement Therapy in the ageing male. *European Urology*, 38: 355 - 362.
15. Day R. A. Jr. and Underwood A. L. (2000). *Química Analítica Cuantitativa 5ª ed.* Prentice Hall, México, pp. 466 - 493.
16. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (PLM)*. (2006), 52ª ed. Tomo 1, México, pp. 157- 196.
17. Díez-Rodríguez, M. V. (1999). *Genéricos. Claves para su conocimiento y comprensión*. Editores Médicos, S.A. Madrid, pp. 17 - 102.
18. Donoso M., Ghaly E. (2004). Prediction of drug dissolution from tablets using near – infrared diffuse reflectance spectroscopy as a nondestructive method. *Pharm. Develp. And Techno.*, 3 (9): 247 – 263.
19. Duerst, R. W.; Duerst, M. D.; Stebbings, W. L. (1998). *Transmission Infrared*

Spectroscopy. Modern Methods of Applied Molecular Spectroscopy; John Wiley & Sons, New York.

20. Dunitz, J. D. and Bernstein, J. (1995). Disappearing Polymorphs. *Acc. Chemical Res.*, **28** (4): 193 – 200.
21. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª ed. (2004). Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud, México, pp. 330.
22. Fletton R. A., Harris R. K., Kenwright A. M. (1987) A comparative spectroscopic investigation of three pseudopolymorphs of testosterone using solid-state i.r. and high resolution solid-state NMR. *Spectrochimica Acta*, **43A** (9): 1111 – 1120.
23. Food and Drug Administration. Guideline for Submitting Supporting Documentation in Drug Applications for the Manufacture of Drug Substances; FDA Center for Drug Evaluation and Research; Office of Drug Evaluation: Rockville, Maryland, 87.
24. Frokjoer S. and Andersen S. (1974). Application of differential scanning calorimetry to the determination of the solubility of a metastable drug. *Arch. Pharm. Chem. Sci.*, **2**: 50 – 59.
25. Gharavi M. and James K. C. (1983). The properties of testosterone and related androgens crystallized from normal alkanols, *Inter. J. of Pharm.*, **14**: 325 – 331.
26. Giron D. (1995). Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates, *Thermochim. Acta*, **248**: 1 - 59.
27. Giron, D. (1986). Applications of thermal analysis in the pharmaceutical industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **71** (4): 439 - 442.

28. Goodman A., Rall Theodore, Nies A., Taylor P., Goodman and Gilman (1993), The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, Inc., pp. 1413 - 1430.
29. Goodman A., Rall Theodore, Nies A., Taylor P., Goodman and Gilman (2003). The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, Inc., pp. 1531 - 1546.
30. Greco Macle, C.M. (1986). Crystal growth in pharmaceutical formulation. *Int. J. Pharm.*, **24**: 233 – 237.
31. Guía de validación de métodos analíticos (2002). Comisión de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México, A. C. México, pp. 17 - 54.
32. Guyton A. (2001). Manual de Fisiología Médica, 10<sup>a</sup> ed., Editorial Mc. Graw - Hill, México, pp. 919 - 1072.
33. Haleblian, J. K. and McCrone, W. (1969). Pharmaceutical applications of polymorphism. *J. Pharm. Sci.*, **58** (8): 911 - 929.
34. Haleblian, J. K. et al. (1975). Characterization of habits and crystalline modification of solid and their pharmaceutical applications. *J. Pharm Sci.*, **64** (8): 1269 -1288.
35. Hendriksen, B. A.; Grant, D. J. W. (1995). The effect of structurally related substances on the nucleation kinetics of paracetamol (acetaminophen) *J. Cryst. Growth*, **156**: 252 – 260.
36. Higuchi T. (1958). Journal of the American Pharmaceutical Association, Scientific Edition, 47: 657 - 660.

37. Hurtado M., Vargas Y., Cortes A. R., Aoky K. y Domínguez A. (2004). Velocidad de disolución intrínseca de albendazol, *Rev. Mex. de Cs. Farm.* **35** (4): 21 -27.
38. Hüttenrauch, R. (1988). Fundamentals of pharmaceuticals. *Acta Pharm. Technol.*, **34** (1): 1 – 10.
39. Jackson J. V., Moss M., Widdop B. (1989). Clarke's, Isolation and Identification of Drugs, 2<sup>th</sup> ed., The Pharmaceutical Press London, pp. 1003.
40. Jenkins, R.; Snyder, R. L. (1996). Introduction to X-Ray Powder Diffractometry; Wiley, New York, NY.
41. Jinno J., Crison J. R., Amidon G. L., (2000). Dissolution of ionizable water – insoluble drugs: the combined effect of pH and surfactant. *J. Pharm Sci.*, **89**: 268 - 274.
42. Kang I.P. (1974). Polymorphic forms of testosterone, *Aust. J. Pharmaceutical Sciences*, **NS3** (2): 55 - 56.
43. Kurth W. and Janger Y. (1965). *Spectrochimica Acta*, **23**: 1004 - 1011.
44. Martin A. (1993). Physical Pharmacy 4<sup>a</sup> ed. Williams & Wilkins. Philadelphia, pp 212 – 250.
45. Matsumoto A. M. (2002) Clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging men. *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.*, **57**: M76 - M99.
46. Merck Index, (2001). 13<sup>th</sup> ed. Merck & Co., Inc, USA, pp. 1638.
47. Mersman, A. (1995). Crystallization Technology Handbook; Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 352 – 355.

48. Mesley R. J. (1966). *Spectrochimi Acta*, **22**: 889 - 917.
49. Mesley, R. J. and Johnson, C. A. (1965), *J. Pharm. Pharmacol.*, **17**: 329.
50. Morales A., Heaton J. P., Carson C. C. (2000). III. Andropause: a Misnomer for a True clinical Entity. *Journal of Urology*, **163**: 705 -712.
51. Mullin J. W. (1993). *Crystallization*; Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, 1993.
52. Myerson, A. S. (1993). *Handbook of Industrial Crystallization*. Butterworth – Heinemann Ltd., Oxford, pp. 859-892.
53. Nichols, G.; Frampton, C. S. (1998). Physicochemical characterization of the orthorhombic polymorph of paracetamol crystallized from solution. *J. Pharm. Sci.*, **87**: 684 – 692.
54. Novak A., Brod M., Elbers J. (2002) Andropause and quality of life Findings from patient focus groups and clinical experts. *Maturitas.*, **43**: 231-237.
55. Nyvlt, J.; Söhnel, O.; Matuchová, M.; Broul, M. (1985). *The Kinetics of Industrial Crystallization*. Elsevier. New York, pp. 152-189
56. Otsuka, M. and Matsuda, Y. (1995). Polymorphism: Pharmaceutical Aspects. In: Swarbrick, J. and Boylan, J.C. (eds). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Vol. 12. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 305-326.
57. Paeddeep K. G. (2006). Remington. *The Science and Practice of Pharmacy*. 21<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, pp. 227 - 228.
58. Perepezko, J. H. (1977). *Kinetic Processes in Undercooled Melts*, *Materials Science and Engineering A – Structural Materials Properties Microstructure and*



Processing, 226: 374 – 382.

59. Perepezko, J. H. (1994). Nucleation Reactions in Undercooled Liquids. *Materials Science and Engineering A – Structural Materials Properties Microstructure and Processing*, 178 (1 – 2): 105 – 111.
60. Quirino B. C. T. (2001). Estudios de preformulación sobre los efectos del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en la cristalización de la tolbutamida. Tesis doctoral. Univ. Comp. Madrid, España.
61. Quirino B. C. T; del Castillo G, B. y Lastres G. J. L. (2003), El estado de agregación molecular de los sólidos. Repercusiones en el diseño de medicamentos y en las farmacopeas I. *Rev. Mex. Cs. Farm.*, **35** (3): 27 – 33.
62. Rain J. (2001) Andropause. Testosterone replacement therapy for ageing men. *Ca. Fam. Physician*. **47**:91-97.
63. Raw, A. S.; Furness, M. S.; Gill, D. S.; Adams, R. C.; Holcombe Jr., F. O. and Yu, L. X. (2004). Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**: 397 - 414.
64. Roberts P. J., Pettersen R. C., Sheldrick G. M., Isaacs N. W. and Kennard O. (1978). Crystal and molecular structure of 17 $\beta$ -Hydroxyandrost-4-en-3-one (Testosterone). *J.C.S. Perkin II*: 105-109
65. Rodríguez-Hornedo N. (1990). Crystallization and the properties of crystals. In: Swarbrick, J. and Boylan, J.C. (eds). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Vol. 3, Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 399 - 434.
66. Rodríguez-Hornedo, N.; Lechuga – Ballesteros, D.; Wu, H. J. (1992). Phase transition and heterogeneous epitaxial nucleation of hydrated and anhydrous

theophylline crystals. *Int J. Pharm.*, **85** (1 – 3): 149 - 162.

67. Sansd D. (1993). *Introducción a la Cristalografía*, Editorial Reverté S.A., España, pp. 15 - 42.
68. Shefter, E. (1981). Solubilization by Solid-State Manipulation. Cap. 5. In: Yalkowsky, S.H. (ed). *Techniques of Solubilization of Drugs*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 159-182.
69. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. (1991). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5<sup>th</sup> ed.; John Wiley & Sons, New York pp 324 – 354.
70. Smith C. y Reynard A. (1998). *Farmacología Médica*, Editorial Panamericana, México, pp. 649 – 659.
71. Soriano M. (2000). *Cristalografía de proteínas. Guía Práctica*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 25, 49- 69.
72. Surana R. and Suryanarayanan R. (2000). Quantitation of crystallinity in substantially amorphous pharmaceutical and study of crystallization kinetics by X-ray powder diffractometry. *Powder Diffr*, 15 (1): 2-6.
73. Tiller W. (1991). *The Science of Crystallization. Macroscopic Phenomena and Defect Generation*. Cambridge University Press, London pp. 98 –116.
74. U.S Pharmacopoeia National Formulary USP 29, NF 21, pp. 1781, 2077.
75. Vippagunta S. R., Brittain H. G., Grant D. J. (2001). Crystalline solids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (**48**): 3 - 26.
76. Yu L. X., Carlin A. S., Amidon G. L., Hussain A. S. (2004). Feasibility studies of

utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *Int. J. of Pharm.*, (270): 221 – 227.

77. Wadke D. A., Reier G. E., (1972). Use of disk intrinsic dissolution rates to determine thermodynamic parameters associated with phase transitions. *J. Pharm. Sci.*, **61**: 868 – 871.

78. Wall, G.M., (1986). Pharmaceutical applications of drug crystal studies. *Pharm. Manufac.* 3 (2): 33-41.

79. Zettlemoyer, A. C. (1969). *Nucleation*; Marcel Dekker, Inc.: New York.

# *ANEXOS*

**12. ANEXOS**

**12.1 TABLAS DE SOLUBILIDAD PARA TESTOSTERONA ANHIDRA Y MONOHIDRATOS I Y II EN DIFERENTES SISTEMAS DE DISOLVENTES.**

**A.1) Resultados de solubilidad de testosterona anhidra en sistema acuoso.**

RÉPLICA	SOLUBILIDAD µg/L 15°C	SOLUBILIDAD µg/L 25°C	SOLUBILIDAD µg/L 35°C	SOLUBILIDAD µg/L 45°C	SOLUBILIDAD µg/L 55°C
1	6.1720	8.7273	10.3240	15.9770	24.004
2	6.1720	8.8632	10.0990	16.3300	23.062
3	6.3151	8.9462	10.2440	16.4200	23.684
n =	3	3	3	3	3
PROMEDIO =	6.2	8.8	10.2	16.2	23.6
D. E. =	8.2619E-02	1.1051E-01	1.1405E-01	2.3415E-01	4.7900E-01
C.V. =	1.3	1.2	1.1	1.4	2.0

**A.2) Resultados de solubilidad de testosterona anhidra en el sistema binario acetona:agua proporción (65:35).**

RÉPLICA	SOLUBILIDAD µg/L 15°C	SOLUBILIDAD µg/L 25°C	SOLUBILIDAD µg/L 35°C
1	16490.0	19601.0	20920.0
2	16641.0	18895.0	21134.0
3	16636.0	18872.0	21147.0
n =	3	3	3
PROMEDIO =	16589.0	19122.7	21067.0
D. E. =	8.5773E+01	4.1441E+02	1.2747E+02
C.V. =	0.5	2.2	0.6

**A.3) Resultados de solubilidad de testosterona anhidra en el sistema binario acetona:agua proporción (80:20).**

<b>RÉPLICA</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 15°C</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 25°C</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 35°C</b>
1	24654.0	35679.0	45235.0
2	24370.0	37115.0	45368.0
3	24321.0	37104.0	45287.0
n =	3	3	3
PROMEDIO =	24448.3	36632.7	45296.7
D. E. =	1.7979E+02	8.2592E+02	6.7025E+01
C.V. =	0.7	2.3	0.1

**A.4) Resultados de solubilidad de testosterona anhidra en el sistema binario acetona:agua proporción (90:10).**

<b>RÉPLICA</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 15°C</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 25°C</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 35°C</b>
1	35064.0	54417.0	75293.0
2	34721.0	54833.0	75896.0
3	34712.0	54945.0	75419.0
n =	3	3	3
PROMEDIO =	34832.3	54731.7	75536.0
D. E. =	2.0068E+02	2.7820E+02	3.1807E+02
C.V. =	0.6	0.5	0.4

**A.5) Resultados de solubilidad de testosterona anhidra en el sistema binario etanol:agua proporción (90:10).**

RÉPLICA	SOLUBILIDAD µg/L 15°C	SOLUBILIDAD µg/L 25°C	SOLUBILIDAD µg/L 35°C
1	33089.0	50218.0	72246.0
2	33471.0	50957.0	72745.0
3	33981.0	50328.0	72912.0
n =	3	3	3
PROMEDIO =	33513.7	50501.0	72634.3
D. E. =	4.4753E+02	3.9872E+02	3.4652E+02
C.V. =	1.3	0.8	0.5

**A.6) Resultados de solubilidad de testosterona monohidrato I en sistema acuoso.**

RÉPLICA	SOLUBILIDAD µg/L 15°C	SOLUBILIDAD µg/L 25°C	SOLUBILIDAD µg/L 35°C	SOLUBILIDAD µg/L 45°C	SOLUBILIDAD µg/L 55°C
1	1.2451	2.7719	3.3050	4.9770	7.054
2	1.2810	2.9634	3.9010	4.8300	7.062
3	1.2531	2.9563	3.2440	4.8200	7.184
n =	3	3	3	3	3
PROMEDIO =	1.3	2.9	3.2	4.9	7.1
D. E. =	1.8847E-02	1.0857E-01	1.0471E-01	8.7900E-02	7.2856E-02
C.V. =	1.5	3.7	3.3	1.8	1.0

A.7) Resultados de solubilidad de testosterona monohidrato I en el sistema binario acetona:agua proporción (90:10).

RÉPLICA	SOLUBILIDAD μg/L 15°C	SOLUBILIDAD μg/L 25°C	SOLUBILIDAD μg/L 35°C
1	356.0	541.0	729.0
2	342.0	583.0	789.0
3	341.0	594.0	741.0
n =	3	3	3
PROMEDIO =	346.3	572.7	753.0
D. E. =	8.3865E+00	2.7970E+01	3.1749E+01
C.V. =	2.4	572.7	4.2

A.8) Resultados de solubilidad de testosterona monohidrato I en el sistema binario etanol:agua proporción (90:10).

RÉPLICA	SOLUBILIDAD μg/L 15°C	SOLUBILIDAD μg/L 25°C	SOLUBILIDAD μg/L 35°C
1	296.0	411.0	699.0
2	292.0	413.0	691.0
3	291.0	414.0	694.0
n =	3	3	3
PROMEDIO =	293.0	412.7	694.7
D. E. =	2.6458E+00	1.5275E+00	4.0415E+00
C.V. =	0.9	0.4	0.6



**A.9) Resultados de solubilidad de testosterona monohidrato II en sistema acuoso.**

<b>RÉPLICA</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 15°C</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 25°C</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 35°C</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 45°C</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 55°C</b>
1	2.125	3.771	5.905	6.589	8.247
2	2.195	3.763	5.901	6.541	8.289
3	2.178	3.756	5.944	6.532	8.211
n =	3	3	3	3	3
PROMEDIO =	2.2	3.8	5.9	6.6	8.2
D. E. =	3.6510E-02	7.5056E-03	2.3756E-02	3.0643E-02	3.9038E-02
C.V. =	1.7	0.2	0.4	0.5	0.5

**A.10) Resultados de solubilidad de testosterona monohidrato II en el sistema binario acetona:agua proporción (90:10).**

<b>RÉPLICA</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 15°C</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 25°C</b>	<b>SOLUBILIDAD µg/L 35°C</b>
1	425.0	687.0	854.0
2	428.0	682.0	851.0
3	429.0	689.0	856.1
n =	3	3	3
PROMEDIO =	427.3	686.0	853.7
D. E. =	2.0817E+00	3.6056E+00	2.5632E+00
C.V. =	0.5	0.5	0.3

A.11) Resultados de solubilidad de testosterona monohidrato II en el sistema etanol:agua proporción (90:10).

RÉPLICA	SOLUBILIDAD μg/L 15°C	SOLUBILIDAD μg/L 25°C	SOLUBILIDAD μg/L 35°C
1	335.0	498.0	787.0
2	339.0	491.0	782.0
3	331.0	497.0	799.9
n =	3	3	3
PROMEDIO =	335.0	495.3	789.6
D. E. =	4.0000E+00	3.7859E+00	9.2360E+00
C.V. =	1.2	0.8	1.2